

**Mutationen in *MT-ATP6* als Ursache von Spinocerebellärer Ataxie (SCA)**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Amrei Hofmann

aus Oberwesel

Gießen 2018

Aus dem Institut für Humangenetik  
unter der Leitung von Prof. Dr. Ulrich Müller,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Dagmar Nolte
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Neubauer

Tag der Disputation: 18.09.2019

Teile dieser Arbeit werden aktuell für eine Publikation zusammengefasst:

Nolte D, Kang JS, Hofmann A, Schwaab E, Müller U (2019)

***MT-ATP6* mutations are a common cause of adult-onset spinocerebellar ataxia**

*Movement Disorders*, in preparation

## Inhalt

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Ataxie als Symptom .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Klassifikation der Ataxien .....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Primäre und sekundäre Ataxien.....	2
1.2.2. Autosomal-rezessiv vererbte Ataxien.....	3
1.2.3. Autosomal-dominant vererbte Ataxien .....	5
1.2.3.1. SCA: Autosomal-dominante Spinocerebelläre Ataxien .....	5
1.2.4. X-chromosomal vererbte Ataxien .....	8
1.2.5. Mitochondrial vererbte Ataxien .....	9
<b>1.3. Mitochondriale Ataxiesyndrome .....</b>	<b>10</b>
1.3.1. Besonderheiten des mitochondrialen Genoms .....	10
1.3.2. Mitochondriopathien .....	12
1.3.3. <i>MT-ATP6</i> .....	14
1.3.4. Mutationen in <i>MT-ATP6</i> und zugehörige Krankheitsbilder .....	16
1.3.4.1. Genetik der MT-ATP6-assoziierten Krankheitsbilder.....	17
1.3.5. Weitere Assoziationen zu <i>MT-ATP6</i> .....	18
<b>1.4. Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>20</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Material .....</b>	<b>21</b>
2.1.1. Chemikalien.....	21
2.1.2. Puffer und Lösungen .....	21
2.1.3. Enzyme und Nukleotide .....	22
2.1.4. Primer .....	22
2.1.5. Kits .....	22
2.1.6. Geräte und Laborausstattung.....	22

2.1.7. Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.8. Softwareprodukte und Datenbanken .....	24
<b>2.2. Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.2.1. Patientenkollektiv .....	24
2.2.2. DNA-Extraktion .....	24
2.2.2.1. DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit.....	24
2.2.2.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA.....	25
2.2.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	25
2.2.3.1. Prinzip der PCR.....	25
2.2.3.2. Durchführung der PCR an MT-ATP6 .....	27
2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese .....	28
2.2.4.1. Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.2.4.2. Durchführung der Gelelektrophorese .....	28
2.2.5. Reinigung der PCR-Produkte .....	29
2.2.6. Sequenzierung .....	30
2.2.6.1. Prinzip der Sanger-Sequenzierung .....	30
2.2.6.2. Durchführung der Sequenzierung.....	32
2.2.6.3. Aufreinigung des Sequenzierproduktes.....	32
2.2.6.4. Sequenzanalyse mit SeqScape.....	33
2.2.7. Bioinformatische Analyse von Polymorphismen/ Sequence Alignment .....	33
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1. Studienpopulation.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2. Sequenzanalyse .....</b>	<b>36</b>
3.2.1. Bekannte Varianten (benigne).....	38
3.2.2. Bekannte Varianten (möglicherweise pathogen).....	41
3.2.3. Neu identifizierte Varianten (vermutlich benigne).....	44

3.2.4. Neu identifizierte Varianten (möglicherweise pathogen).....	47
3.2.5. Konservierung mutierter Aminosäuren .....	49
3.2.6. Fallberichte .....	51
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Häufigkeit der SCAs.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2. Mutationen und Polymorphismen in <i>MT-ATP6</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3. Genetik der putativen Mutationen.....</b>	<b>54</b>
4.3.1. Frequenz und Konservierung .....	55
4.3.2. Lokalisation und funktionelle Relevanz .....	57
<b>4.4. Komplex-V-Defizienz .....</b>	<b>58</b>
4.4.1. Die <i>MT-ATP6</i> -assoziierte Ataxie des Erwachsenenalters .....	58
4.4.2. SCA-MTATP6 im Kontext von MILS, NARP, APAO und MIBSN.....	60
4.4.3. Empfehlung: <i>MT-ATP6</i> in der genetischen Testung und Diagnostik.....	62
<b>4.5. Ausblick .....</b>	<b>63</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>65</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>10. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>11. Erklärung zur Dissertation .....</b>	<b>84</b>
<b>12. Danksagung.....</b>	<b>85</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Ataxie als Symptom

Der Begriff Ataxie, vom griechischen ἀταξία, zu Deutsch Unordnung, beschreibt ein Krankheitsbild, das sich am Einfachsten als „Störung der Koordination von Bewegungsabläufen, meist infolge eines gestörten Zusammenspiels verschiedener Muskelgruppen (Asynergie) und aufgrund falscher Abmessung von Zielbewegungen (Dysmetrie)“ beschreiben lässt (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2017, S. 169). Das Cerebellum mit seinen afferenten und efferenten Bahnen, Leitungsbahnen und Schaltstellen in Rückenmark und Basalganglien, sowie die peripheren Nerven sind essentielle Bestandteile in der Planung und Ausführung von Bewegung und Gleichgewicht (Bird 2016; Hacke 2016; Akbar und Ashizawa 2015). Akbar und Ashizawa verwenden für diesen Zusammenhang den Begriff eines komplexen Schaltkreises, Dysfunktionen auf jeder einzelnen Ebene beeinträchtigen dabei die korrekte Bewegungsausführung. Es kommt zum klinischen Bild der Ataxie. Klassischerweise sind Gangstörungen, Dysarthrie, und Störungen der Okulomotorik Teil des Symptomkomplexes; auch Dysdiadochokinese, überschießende und unregelmäßige Extremitätenbewegungen, und Intentionstremor treten gehäuft auf. Je nachdem welcher Abschnitt des Leitungssystems primär betroffen ist, kommt es zu unterschiedlichen Krankheitsbildern. Ein Ausfall der sensiblen Afferenzen führt zur sogenannten sensorischen Ataxie, ein Wegfall der optischen Kontrolle spricht für eine Beteiligung des Kleinhirns. Abzugrenzen ist die Apraxie, bei der die Bewegungsstörung aufgrund einer fehlerhaften Planung bei erhaltener motorischer Funktion zustande kommt (Akbar und Ashizawa 2015; Lexikon der Neurowissenschaft 2000).

**Tabelle 1: Übersicht über Symptome im Rahmen von ataktischen Erkrankungen**

---

**Klassische Symptome der Ataxie**

---

Asynergie, Dyssynergie (Fehlendes/ gestörtes Zusammenspiel versch. Muskelgruppen)  
Gangstörungen; schwankender, breitbeiniger Gang  
fehlende Rumpfstabilität im Sitzen  
Standunsicherheit  
Gleichgewichtsstörung, Fallneigung  
Hypotonie (Niedriger Muskeltonus)  
Dysmetrie  
Dysarthrie, skandierende (langsam, abgehackt-stockend) oder verwaschene Sprache

Dysmetrie der Okulomotorik, Gestörte Fixation

Nystagmus, sakkadierte Blickfolge

Aktionstremor

Dysdiadochokinese

---

(Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2017; Hacke 2016)

Zur Diagnostik werden Beobachtungen von Stand, Gangbild, Sprache und Augenbewegungen dokumentiert, außerdem kommen Einzelreflexprüfungen und standardisierte Tests zu Gleichgewicht und Koordination zum Einsatz. Klassischerweise finden der Romberg-Versuch, der Finger-Folge-Versuch (FFV), der Finger-Nase-Versuch (FNV), der Knie-Hacke-Versuch (KHV) und die Probe des Seiltänzergangs Anwendung. Weitere Hinweise auf die zugrunde liegende Erkrankung liefern eine ausführliche Anamnese inklusive Manifestationsalter, nicht-neurologische Zusatzsymptome und die Familienanamnese, sowie eine MRT-Bildgebung der hinteren Schädelgrube (Hacke 2016; Bird 2016).

## 1.2. Klassifikation der Ataxien

### 1.2.1. Primäre und sekundäre Ataxien

Ataxien können primär angeboren oder sekundär erworben, Teil einer Multisystemerkrankung oder organspezifisch sein. Darüber hinaus kann eine Ataxie auch als Begleitsymptom anderer Erkrankungen vorkommen.

Sekundäre Ataxien, bei denen eine nicht-genetische Pathologie Grund der neuronalen Schädigung und der daraus resultierenden sensomotorischen Bewegungsstörung ist, sind in der klinischen Betrachtung differentialdiagnostisch sehr wichtig. Da im Falle einer sekundären Ataxie eine Behandlung der Primärerkrankung eine Besserung, oder zumindest ein Sistieren der Progression bewirken kann, ist ein Überblick über die möglichen Ursachen dieser Ataxieform notwendig.

**Tabelle 2: Sekundäre Ataxie und ihre Ursachen**

---

#### Mögliche Ursachen einer sekundärer Ataxie

---

Vaskulärer Insult, Schlaganfall, Globale Hypoxie

Hirndruck (z.B. Hydrozephalus)

Strukturell (z.B. Posttraumatisch, kongenitale Fehlbildung)

Neoplasie, Tumor

Endokrin (z.B. Hypothyreose)



Vitaminmangelzustände (z.B. Vitamin B1, B12, E)  
 Toxisch (z.B. Alkoholabusus, Schwermetallbelastung, Toluolderivate, Siderose)  
 Iatrogen (z.B. Chemotherapeutika, Antiepileptika)  
 Infektiös/Postinfektiös (z.B. Cerebellitis bei u.a. VZV, HIV, bakterielle Meningitis, Creutzfeld-Jakob, etc.)  
 Paraneoplastisch (z.B. Anti-Hu, Anti-Yo/Anti-Ri)  
 Autoimmun (z.B. Anti-GAD, Anti-TG, Multiple Sklerose)  
 Thermische cerebelläre Degeneration (z.B. Hitzschlag, Sepsis, Malignes Neuroleptisches Syndrom)

---

(Akbar und Ashizawa 2015; Nachbauer et al. 2015)

Im Gegensatz zu den sekundär erworbenen Ataxien sind die sogenannten Heredoataxien genetisch bedingt. Sie lassen sich anhand ihres jeweiligen Erbgangs in autosomal-rezessiv (AR), autosomal-dominant (AD), X-chromosomal und mitochondrial vererbte Ataxien einteilen. Wie von Bird (2016) dargelegt, ist die Nomenklatur der Heredoataxien im Rahmen der kontinuierlichen Forschung und neuer Erkenntnisse in fortlaufendem Wandel, die große Zahl an Subtypen und deren schwierige klinische Unterscheidung derselben erschweren oft eine klare, initiale Einordnung (Bird 2016). Außerdem lassen sich parallel zur Klassifikation nach Vererbungsmuster auch Einteilungen anhand klinischer Merkmale vornehmen, die sich nur teilweise überschneiden. Die bisher bekannten Episodischen Ataxien werden beispielsweise fast ausschließlich autosomal-dominant vererbt (Choi und Choi 2016), bei den durch ihren spastischen Anteil charakterisierten Spastischen Ataxien (SPAX) kommen sowohl die autosomal-dominante als auch die autosomal-rezessive Vererbung vor (de Bot et al. 2012).

### 1.2.2. Autosomal-rezessiv vererbte Ataxien

Autosomal rezessiv vererbte Heredoataxien werden unter der Bezeichnung Autosomal-rezessive Spinocerebelläre Ataxien (spinocerebellar ataxia, autosomal-recessive, SCAR) zusammengefasst. Erkrankte sind in der Regel homozygot, d.h. mit identischen Mutationen, oder compound heterozygot, mit zwei unterschiedlichen Mutationen auf den betroffenen Allelen (oder Genen). Die gesunden Eltern sind Träger jeweils einer der beiden nachgewiesenen Mutationen. Ein besonderes Erkrankungsrisiko haben Kinder konsanguiner Eltern.

Der prominenteste Vertreter der autosomal-rezessiv vererbten Ataxien ist die Friedreich Ataxie (FA, FRDA). Sie gilt als die häufigste Heredoataxie, Epplen und Mitarbeiter ermittelten für Deutschland eine Heterozygotenfrequenz von 1:60-1:90 (Epplen et al.

1997). Das Krankheitsbild der FA ist durch eine Vielzahl von Symptomen charakterisiert. Klassisch sind der Krankheitsbeginn im Jugendalter und ein progredienter Verlauf der Erkrankung. Zu den Kardinalsymptomen gehören Gang- und Standataxie, Dysarthrie, Muskelschwäche und Reflexabnormalitäten der unteren Extremität sowie der Verlust von Vibrationsempfinden und Propriozeption. Häufig kommt es neben den typischen neuromuskulären Symptomen auch zu Knochendeformitäten, Kardiomyopathie und Diabetes mellitus (Delatycki et al. 2000). Die Erkrankung geht mit einem neuronalen Substanzverlust der spinocerebellären Leitungsbahnen einher, betroffen sind die Hinterstränge des Rückenmarks, Anteile von Medulla oblongata und Vermis und die Nuclei dentati (Nave et al. 2008). 1990 gelang die Assoziation von FA zum X25 Gen auf Chromosom 9q13 (Hanauer et al. 1990), Campuzano und Mitarbeiter konnten schließlich in 98% der von ihnen untersuchten Fälle eine GAA-Trinukleotidexpansion im Intron 1 dieses Gens als krankheitsverursachend identifizieren. Normale Allele weisen ca. 7-22 Wiederholungen (repeats) auf, Patienten mit FA besitzen zwei expandierte Allele mit 200 bis über 900 repeats (Campuzano et al. 1996). Der genaue Pathomechanismus ist bislang nicht bekannt. Delatycki und Mitarbeiter beschreiben in ihrem Review die vermutete Beteiligung des pathologisch veränderten Proteins Frataxin am Eisenstoffwechsel. Es kommt zur zellulären und mitochondrialen Eisenüberladung mit resultierend eingeschränkter Funktion der Atmungskette und erhöhter Belastung durch Sauerstoffradikale (Delatycki et al. 2000).

Neben der Friedreich Ataxie umfasst der Begriff der SCAR ein buntes Bild an diversen, meist sehr seltenen Erkrankungen. Sie unterscheiden sich in ihrem Pathomechanismus, dem Manifestationsalter (onset) und der Symptompräsentation. Ihnen allen eigen ist das Auftreten einer spinocerebellären Ataxie, die definierendes Merkmal dieser Gruppe von Erkrankungen ist, daneben weisen sie verschiedene, krankheitsspezifische neurologische und nicht-neurologische Symptome auf (weiterführend: Bird 2016; Akbar und Ashizawa 2015). Besondere Beachtung verdienen die Krankheiten, die aufgrund ihrer Prävalenz, ihrer regionalen Häufung oder durch ihre Behandelbarkeit klinische Relevanz haben. Dazu gehören Friedreich-Ataxie, Ataxia teleangiectatica (AT) und Ataxien mit okulomotorischer Apraxie (AOA) als häufige Formen der autosomal-rezessiven Ataxie; Cerebrotendinöse Xanthomatose (CTX), Refsum-Syndrom (refsum disease, RD) und Ataxie mit isoliertem Vitamin-E-Mangel (ataxia

with vitamin E deficiency, AVED) sind behandelbar und sollten deshalb differentialdiagnostisch bedacht werden (Fogel und Perlman 2007; Embirucu et al. 2009; Bird 2016).

### **1.2.3. Autosomal-dominant vererbte Ataxien**

Der Sammelbegriff Autosomal-dominante Cerebelläre Ataxie (ADCA), steht als Überbegriff für autosomal-dominant vererbte Ataxien mit cerebellärer Symptomatik über der Ataxie-Subgruppe mit dem entsprechenden Erbgang. Im Gegensatz zu den autosomal-rezessiven SCAR treten ADCA klassischerweise familiär gehäuft auf, mit Betroffenen in jeder Generation. Heterozygote Merkmalsträger geben das betroffene Allel in 50% der Fälle an ihre Nachkommen weiter. Gegebenenfalls führt reduzierte Penetranz zur Verschleierung des Erbgangs.

Die zwei größten Untergruppen der ADCA sind die meist kontinuierlich progressiven Spinocerebellären Ataxien (SCA), die in einem gesonderten Kapitel beschrieben werden, und die Episodischen Ataxien (EA).

Die Episodischen Ataxien sind Erkrankungen mit heterogenem Erscheinungsbild, deren vereinigendes Merkmal anfallsweise, zum Teil durch Stress getriggerte, intermittierende Phasen von Stammalexie und Koordinationsbeschwerden sind. Unterschieden werden die bisher bekannten EAs anhand ihrer klinischen Darstellung und der erst teilweise bekannten genetischen Ursache. Dabei sind bislang die Krankheitsbilder EA1 und EA2 aufgrund ihres Auftretens in multiplen Familien klar definiert und beschrieben (Jen et al. 2007; Choi und Choi 2016). Die Identifizierung und klinische Abgrenzung anderer episodischer Ataxien ist durch eine Überlappung der Symptome erschwert. Neben ataktischen Episoden unterschiedlicher Dauer liegen häufig Schwindel, Dysarthrie, Tremor, Übelkeit und Schwächegefühl vor, interiktal reicht das Bild von Symptombefreiheit bis zu Myokymie, Nystagmus oder Ataxie. Gemeinsamkeiten in der Ätiopathogenese werden angenommen, da in vier der fünf bekannten genetischen Loci Komponenten der Erregungsleitung, beispielsweise die von *KCNA1* (EA1) und *CACNA1A* (EA2) codierten Ionenkanäle, betroffen sind (Choi und Choi 2016).

#### **1.2.3.1. SCA: Autosomal-dominante Spinocerebelläre Ataxien**

Der Begriff Spinocerebelläre Ataxie, ursprünglich mit der Beschreibung der autosomal-rezessiven Friedreich-Ataxie formuliert, hat im Laufe der Zeit seine Bedeutung

verändert. Heute dient er der Beschreibung autosomal-dominant vererbter cerebellärer Syndrome. Die ursprüngliche von Harding vorgelegte phänotypenbasierte Einteilung (Harding 1982, 1983) wurde nach Etablierung molekulargenetischer Diagnosemöglichkeiten verlassen. Aktuell ist es üblich, autosomal-dominante Spinocerebellären Ataxien über die zugrunde liegende genetische Pathologie zu identifizieren und fortlaufend zu nummerieren.

Die Verdachtsdiagnose SCA wird gestellt, wenn Auffälligkeiten in der neurologischen Untersuchung (gestörte Koordination in Gang und Haltung, Bewegungsstörungen von Hand/Fingern, Nystagmus, Dysarthrie) bei gleichzeitigem Vorliegen von Hinweisen auf einen entsprechenden Erbgang bestehen (auffällige Familienanamnese) (Bird 2016). Bildgebende Maßnahmen mit Nachweis einer cerebellären Atrophie erhärten den Verdacht. Kann diesem klinischen Phänotyp eine genetische Ursache zugeordnet werden, so wird er als neue SCA klassifiziert. Einzelne SCAs wurden dabei nicht vergeben oder die Vergabe im Zuge neuer Erkenntnisse revidiert.

Anhand ihres Mutationsmechanismus (vgl. Tabelle 3) können die einzelnen SCAs wiederum zu Untergruppen zusammengefasst werden (zusammengefasst in: Margolis 2003). Eine dieser Gruppen umfasst Erkrankungen mit Repeatexpansion. Bei SCA1, 2, 3, 6, 7 und 17 handelt es sich um sogenannte Polyglutaminerkrankungen (Poly-Q-Erkrankungen), krankheitsverursachend sind Expansionen des Trinukleotids CAG im codierenden Bereich und deren Translation mit repetitivem Einbau der Aminosäure Glutamin (Orr et al. 1993; Banfi et al. 1994). Bei anderen SCAs liegen die Mikrosatelliten-Expansionen im untranslatierten Bereich (SCA12), intronisch (SCA31), oder umfassen Basensequenzen, die nicht für Glutamin codieren (z.B. SCA10) (Holmes et al. 1999; Matsuura et al. 2000). Als Ursache einer weiteren SCA-Untergruppe wurden zumeist Punktmutationen/Substitutionen identifiziert, daneben treten auch Insertionen und Deletionen mit Leserasterverschiebung (frameshift, z.B. bei SCA11) oder unter Erhalt des Leserasters (in-frame, z.B. bei SCA5) auf (Houlden et al. 2007; Ikeda et al. 2006). Im Fall von SCA15 konnten neben missense Mutationen große Deletionen der Gene *ITPR1* und *SUMF1* identifiziert werden (van de Leemput et al. 2007), dem Bild der SCA20 liegt eine 260kb-Duplikation zugrunde (Knight et al. 2008).

Repeatexpansionen wirken über unterschiedliche Mechanismen pathogen, bekannt sind Erkrankungen mit Verlust der Proteinfunktion (loss-of-function), Erkrankungen mit

RNA-vermitteltem ‚gain-of-function‘, Erkrankungen mit proteinvermitteltem gain-of-function (i.d.R. Polyglutaminerkrankungen), und Erkrankungen mit unbekanntem Mechanismus (Orr und Zoghbi 2007). Typisch für Repeat-Expansions-Erkrankungen ist das Phänomen der Antizipation: je höher die Anzahl der repeats, desto früher die Manifestation und desto ausgeprägter die Symptome (Orr und Zoghbi 2007). Als ursächlich dafür gilt die Weitergabe eines verlängerten Repeat-Abschnitts von einer Generation zur nächsten im Rahmen der intergenerationellen Instabilität (Fu et al. 1991; Chung et al. 1993; David et al. 1997). Allerdings existieren wahrscheinlich weitere, nicht-trinukleotidasoziierte Einflussfaktoren auf das Erkrankungsalter, Matsuyama und Mitarbeiter konnten beispielsweise Antizipation in von SCA6 betroffenen Familien bei stabiler Repeatzahl beobachten (Matsuyama et al. 1997; van de Warrenburg et al. 2005).

**Tabelle 3: Übersicht über die Autosomal-Dominanten Spinocerebellären Ataxien (SCAs)**

	Gen	Lokus	Protein	Mutation	
SCA1	<i>ATXN1</i>	6p22.3	Ataxin-1	CAG-Expansion	Poly-Q-Erkrankung
SCA2	<i>ATXN2</i>	12q24.12	Ataxin-2	CAG-Expansion	Poly-Q-Erkrankung
SCA3 (MJD)	<i>ATXN3</i>	14q32.12	Ataxin-3 (MJD1)	CAG-Expansion	Poly-Q-Erkrankung
SCA4		16q22.1		unbekannt	
SCA5	<i>SPTBN2</i>	11q13.2	Beta-III-Spektrin	in-frame deletion missense mutation	
SCA6	<i>CACNA1A</i>	19p13.13	Spannungsabhängiger Calciumkanal Typ P/Q, Untereinheit Cav2.1	CAG-Expansion	Poly-Q-Erkrankung
SCA7	<i>ATXN7</i>	3p14.1	Ataxin-7	CAG-Expansion	Poly-Q-Erkrankung
SCA8	<i>ATXN8/</i> <i>ATXN8OS</i>	13q21 13q21.33	Ataxin-8/ Vermeintliches Protein ATXN8OS	CAG/CTG- Expansion	Poly-Q-Protein/ Poly-CUG-RNA, untranslatiert
SCA9	nicht vergeben				
SCA10	<i>ATXN10</i>	22q13.31	Ataxin-10	ATTCT-Expansion	Pentanukleotid-expansion intronisch
SCA11	<i>TTBK2</i>	15q15.2	Tau-Tubulin-Kinase-2	frameshift insertion frameshift deletion	u.a. Prämaures Stop-Codon
SCA12	<i>PPP2R2B</i>	5q32	Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2A Untereinheit B Isoform Beta	CAG-Expansion	Trinukleotid-expansion 5'UTR
SCA13	<i>KCNC3</i>	19q13.33	Spannungsabhängiger Kaliumkanal Untereinheit Kv3.3	missense mutation	
SCA14	<i>PRKCG</i>	19q13.42	Proteinkinase-C- gamma	missense mutation deletion	u.a. Extension bei Stop-Deletion, loss-of-function
SCA15	<i>ITPR1</i>	3p26.1	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor 1	large scale deletion missense mutation	
SCA16	vgl. SCA15				
SCA17 (HDL4)	<i>TBP</i>	6q27	TATA-Bindeprotein	CAG/CAA-Expansion	Poly-Q-Erkrankung
SCA18 (SMNA)	<i>IFRD1*</i>	7q22-q32		unbekannt	
SCA19/	<i>KCND3</i>	1p13.2	Spannungsabhängiger	missense mutation	

22			Kaliumkanal Untereinheit Kv4.3	in-frame deletion	
SCA20		11q12		260kB-Duplikation	
SCA21	<i>TMEM240</i>	1p36.33	Transmembran-protein 240	missense mutation	
SCA23	<i>PDYN</i>	20p1	Proenkephalin-B	missense mutation	
SCA24	nicht vergeben				
SCA25		2p21-p13		unbekannt	
SCA26*	<i>EEF2</i>	19p13.3	Elongationsfaktor 2	missense mutation	
SCA27	<i>FGF14</i>	13q33.1	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 14	missense mutation, frameshift deletion	u.a. Prämaures Stop-Codon bei frameshift, Einschränkung der Proteinfunktion
SCA28	<i>AFG3L2</i>	18p11.21	AFG3-like protein 2 (Untereinheit der m-AAA-Protease)	missense mutation	
SCA29	<i>ITPR1</i>	3p26.1	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor 1	missense mutation	
SCA30*		4q34.3-q35.1		unbekannt	
SCA31	<i>BEAN1</i>	16q21	Protein BEAN1	TGGAA-Expansion	
SCA32		7q32-q33		unbekannt	
SCA33	nicht vergeben				
SCA34	<i>ELOVL4</i>	6q14.1	Fettsäureelongase 4	missense mutation	
SCA35	<i>TGM6</i>	20p13	Transglutaminase 6	missense mutation, in-frame deletion	
SCA36	<i>NOP56</i>	20p13	Nucleolares Protein 56 (Ribonukleoprotein)	GGCCTG-Expansion	Hexanukleotid-expansion, intronisch
SCA37	<i>DAB1</i>	1p32.2	Disabled Homolog 1 /Reelin Adapterprotein	ATTTC-Expansion	Pentanukleotid-expansion, intronisch
SCA38	<i>ELOVL5</i>	6p12.1	Fettsäureelongase 5	missense mutation	
SCA39	nicht vergeben				
SCA40*	<i>CCDC88C</i>	14q32.11-q32.12	Daple Protein	missense mutation	
SCA41*	<i>TRPC3</i>	4q27	TRP-Kanal 3	missense mutation	
SCA42	<i>CACNA1G</i>	17q21.33	Spannungsabhängiger Calciumkanal, Untereinheit CaV3.1	missense mutation	
SCA43*	<i>MME</i>	3q25.2	Neprilysin (Membran-Metalloendopeptidase)	missense mutation	
SCA44	<i>GRM1</i>	6q24.3	Metabotroper Glutamatrezeptor 1	missense mutation, Duplikation mit frameshift	u.a. Prämaures Stop-Codon bei frameshift
DRPLA	<i>ATN1</i>	12p13.31	Atrophin 1	CAG-Expansion	Poly-Q-Erkrankung
ADCADN	<i>DNMT1</i>	19p13.2	DNA-Methyltransferase 1	missense mutation	

\* fraglich, Nachweise zur Verifizierung noch ausstehend

modifiziert nach Bird 2016, www.omim.org

## 1.2.4. X-chromosomal vererbte Ataxien

Liegt ein phänotypverursachendes Gen auf dem X-Chromosom, spricht man von einem X-chromosomalen Erbgang (X-linked inheritance). Krankheiten, bei denen dies der Fall ist, weisen charakteristische Besonderheiten im Vererbungsmuster auf: männliche Genträger sind aufgrund ihrer Hemizygotie zwangsläufig auch Symptomträger, ihre Töchter immer heterozygot für das betreffende Allel. Als Konduktorinnen können diese

aufgrund der variablen Penetranz abgeschwächte krankheitsspezifische Symptome haben, eine Vererbung an ihre Nachkommen erfolgt mit 50%iger Wahrscheinlichkeit (Germain 2006). Zur Ausprägung des klinischen Vollbildes bei weiblichen Patienten kommt es zum einen bei genetischer Homozygotie, bei einem Turner-Syndrom, oder durch ein Ungleichgewicht in der X-Chromosom-Inaktivierung.

Die Kategorisierung von Ataxieformen mit X-chromosomaler Ursache ist bislang uneinheitlich. In der Datenbank OMIM sind unter dem Begriff X-chromosomal vererbte Spinocerebelläre Ataxie (Spinocerebellar Ataxia, X-linked) ausschließlich die fünf Formen SCAX1-5 zusammengefasst.

Bei Zanni und Bertini (2011) oder Bird (2016) finden darüber hinaus auch Erkrankungen mit X-chromosomalem Erbgang und cerebellärer Dysgenese Erwähnung, da diese häufig mit ataktischer Symptomatik einhergehen (Zanni und Bertini 2011; Bird 2016).

**Tabelle 4: Übersicht über die wichtigsten X-chromosomal vererbten cerebellären Syndrome**

Gen	Locus	Protein	Benennung
ABCB7	Xq13.3	ATP binding cassette subfamily B member 7, mitochondrial	X-chromosomale sideroblastische Anämie und Ataxie (XLSA/A)
ATP2B3	Xq23-q24 Xp11.21-q21.3	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3	X-chromosomale cerebelläre Ataxie, Typ1 (SCAX1)
CASK	Xp11.4	calcium/calmodulin dependent serine protein kinase (CASK)	CASK-assoziierte Erkrankungen (MICPCH, XLID)
FMR1	Xq27.3	Synaptic functional regulator FMR1	Fragiles X-Tremor-Ataxie-Syndrom (FXTAS)
OPHN1	Xq12	Oligophrenin-1	X-chromosomale Intelligenzminderung – zerebelläre Hypoplasie
SLC9A6	Xq26.3	Sodium/hydrogen exchanger 6	Christianson Syndrom
Xq25-q27.1 (SCAX5)	Xq25-q27.1	unbekannt	X-chromosomale Spinocerebelläre Ataxie Typ5 (SCAX5)

modifiziert nach Bird 2016, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), [www.omim.org](http://www.omim.org)

### 1.2.5. Mitochondrial vererbte Ataxien

Ataxie als Symptom mitochondrialer Pathologie und Genese spielt eine nicht zu vernachlässigende Rolle in der differentialdiagnostischen Betrachtung. Die genetischen Besonderheiten und die zentrale Rolle des mitochondrialen Stoffwechsels verschaffen

den mitochondrial vererbten Ataxien eine Sonderrolle innerhalb der ataktischen Syndrome.

### 1.3. Mitochondriale Ataxiesyndrome

#### 1.3.1. Besonderheiten des mitochondrialen Genoms

Das humane mitochondriale Genom liegt als zirkuläre Doppelstrang-DNA (ds-DNA) vor und hat eine Größe von 16.569 Basenpaaren (bp). Die beiden Stränge unterscheiden sich im Aufbau: aufgrund des unterschiedlichen Purin-Pyrimidin-Verhältnisses lässt sich ein leichter L (light)-Strang von einem komplementären schweren H (heavy)-Strang abgrenzen. In stoffwechselaktiven Zellen liegt die mitochondriale DNA (mtDNA) allerdings zu einem hohen Anteil in der D-Loop-Konfiguration vor. Dabei wird der H Strang von einem entsprechenden DNA-Fragment, der 7S-DNA, verdrängt, und bildet den D-Loop (displacement Loop), der auch die Promotor- und Kontrollregion der mitochondrialen Transkription beinhaltet. Codiert sind im mitochondrialen Genom die beiden rRNAs der mitochondrialen Ribosomen, 13 Proteine, und die für deren Translation benötigten 22 tRNAs. Die meisten dieser Gene, auch das in dieser Arbeit untersuchte *MT-ATP6*, sind auf dem H-Strang lokalisiert, der deshalb als ‚sense-strand‘ oder als ‚forward-strand‘ bezeichnet wird (Anderson et al. 1981; Taanman 1999). Neben den bekannten, proteincodierenden Genen werden derzeit auch Peptide mitochondrialen Ursprungs untersucht, die vermutlich durch alternative Leseraster generiert werden (Kim et al. 2017).

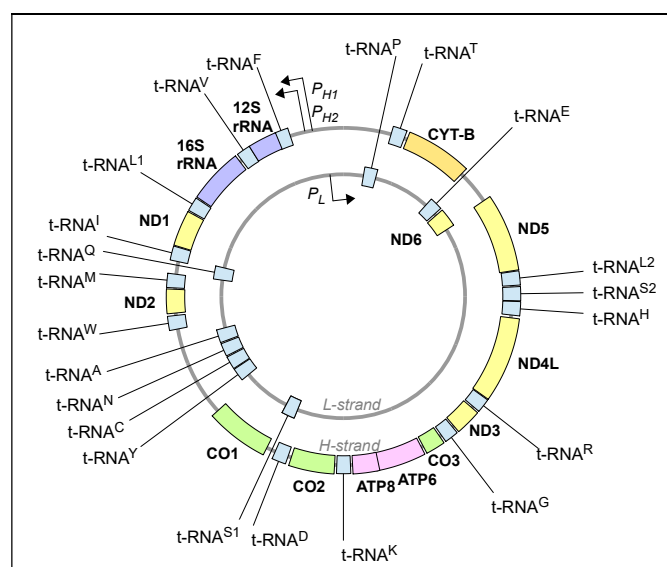


Abbildung 1: Organisation des mitochondrialen Genoms (Anderson et al. 1981; ensembl.org)



Alle 13 mitochondrial codierten Proteine sind Teil des OXPHOS-Systems (oxidative phosphorylation), stellen aber nur einen Bruchteil der über 90 daran beteiligten Komponenten dar. Die übrigen Untereinheiten sind, ebenso wie der Rest des mitochondrialen Proteoms, nukleär codiert, und werden nach cytosolischer Translation mittels spezifischer target-Sequenzen in die Mitochondrien importiert (Chinnery und Hudson 2013; Neupert 2015).

Die mtDNA weist im Gegensatz zur nukleären DNA (nDNA) einige Unterschiede auf. Sie ist durch eine sehr geringe Intronfrequenz gekennzeichnet, im Rahmen der Sequenzbestimmung wurden nur wenige nicht-codierende Basen zwischen den codierenden Sequenzen identifiziert (Anderson et al. 1981). Auch der gentische Code in der mitochondrialen DNA weicht in einigen Punkten vom nukleären ab (Chinnery und Hudson 2013). Einige der proteincodierenden Sequenzen überlappen in den Randbereichen, und sind in der mtDNA nicht durch Stop-Codons terminiert. Stattdessen werden transkribierte mRNAs erst durch posttranslationale Modifikation für die Translation in einzelne Proteine separiert (Taanman 1999).

Im Vergleich zum nukleären Genom treten Mutationen in der mitochondrialen DNA gehäuft auf, Brown und Mitarbeiter ermittelten beispielsweise eine 5-10fach erhöhte Mutationsrate (Brown et al. 1979). Als ursächlich für diese Differenz werden mehrere Faktoren angenommen: Im Blick auf die 1956 von Harman formulierte ‚Theorie der freien Radikale‘, und der räumlichen Nähe der mtDNA-haltigen Matrix zum in der inneren mitochondrialen Membran lokalisierten OXPHOS-System, ist das vermehrte Auftreten von Mutationen aufgrund oxidativer Schädigung plausibel. Auch unzureichende Reparaturmechanismen, das Fehlen protektiver Histone und eine höhere Replikationsrate im Vergleich zur nukleären DNA werden als mutagene Einflüsse gewertet (Brown et al. 1979; Tuppen et al. 2010). Wie hoch der Anteil an mtDNA-Mutationen tatsächlich ist, der durch ROS (Radikale Sauerstoffspezies, radical oxygen species)-induzierte Schäden entsteht, wird jedoch kontrovers diskutiert (Shokolenko et al. 2014).

Das mitochondriale Genom ist außerdem im Gegensatz zum diploiden Kerngenom der somatischen Zellen polyploid, d.h. in der Matrix jedes Mitochondriums einer Zelle liegen mehrere Kopien mtDNA vor. Kommt es durch das gleichzeitige und kontinuierliche Auftreten von Mutationen innerhalb der multiplen Genkopien zum

parallelen Vorliegen verschiedener Genotypen innerhalb einer Zelle, so spricht man von Heteroplasmie. Durch somatische Mutationen, asymmetrische Verteilung der Mitochondrien im Zuge der Mitose und sukzessive klonale Expansion im Differenzierungsprozess kann es zu unterschiedlicher Belastung einzelner Gewebe und zur Mosaikbildung kommen. Die Ausprägung der Symptome und der Krankheitsbeginn sind dadurch bei mitochondrial vererbten Erkrankungen schwer vorhersagbar (Tuppen et al. 2010; Greaves et al. 2012). Eine funktionelle Einschränkung manifestiert sich nach der Schwellentheorie erst dann, wenn der Anteil an schadhaft mutierten Kopien einen gewebe- und mutationsspezifischen Schwellenwert (threshold) überschreitet (Shoffner et al. 1990).

Die Schwere der Erkrankung innerhalb einer Familie wird im Falle einer Heteroplasmie auch durch den sogenannten Flaschenhalseffekt (bottleneck effect) beeinflusst, eine Verminderung der Allelfrequenz durch unspezifische Selektion in der Embryogenese: Im Zuge der Zellteilung kommt es zur Reduktion des Mitochondriengehalts und zur ungleichen Verteilung der mtDNA-Varianten. Von einer Generation zur anderen kann das Genotypen-Verhältnis daher stark schwanken und die Krankheitsausprägung intrafamiliär variieren (Cree et al. 2008). Generell folgen Erkrankungen mitochondrialer Genese einem uniparentalen Vererbungsmuster, die maternale mtDNA wird innerhalb der oozytären Mitochondrien weitergegeben (Giles et al. 1980).

Anhand von Polymorphismen, die in einzelnen Bevölkerungsgruppen gehäuft oder spezifisch auftreten, lassen sich mitochondriale Genome zu Haplotypen zusammenfassen. Die Entstehung dieser Polymorphismen beruht auf der generellen genetischen Drift. Im Rahmen von vorgeschichtlichen Völkerwanderungen, Siedlungsbewegungen und dem sogenannten Gründereffekt fand eine Selektion und Segregation in einzelne Populationen mit gemeinsamen genetischen Merkmalen statt (Mishmar et al. 2003; Herrnstadt et al. 2002; Wallace 1995).

### **1.3.2. Mitochondriopathien**

Die Begriffe mitochondrial vererbt und mitochondriale Erkrankung (Mitochondriopathie) sind nicht synonym zu verwenden. Mitochondrial vererbte Krankheiten, deren Ursache in einer Veränderung der mtDNA liegt, haben in der Regel einen Einfluss auf die mitochondriale Funktion, da mtDNA für essentielle Bestandteile des OXPHOS-Systems sowie Komponenten der eigenen Replikation, Transkription und

Translation codiert (vgl. Kapitel 1.3.1.). Mitochondriale Dysfunktion kann allerdings genauso durch das Fehlen oder durch Fehlfunktion nukleär codierter mitochondrialer Proteine und Faktoren entstehen, der Begriff der Mitochondriopathie umfasst damit sowohl Erkrankungen mit Bezug zu mtDNA als auch zu nDNA, wie im Falle der sogenannten ‚*POLG*-related-diseases‘ (Wong et al. 2008). Auch die nukleär codierte, autosomal-rezessive Friedreich-Ataxie beruht beispielsweise auf einer Störung des mitochondrialen Stoffwechsels (vgl. Kapitel 1.2.2.).

Mitochondrial vererbte Erkrankungen sind durch einen eigenen Vererbungsmechanismus gekennzeichnet. Die Transmission erfolgt maternal, betroffen sind Kinder beiden Geschlechts. Allerdings können aufgrund von Polyploidie, Heteroplasmie und unterschiedlichen Genotypenfrequenzen die Ausprägung und Penetranz innerhalb einer Familie und innerhalb einer Generation variabel sein.

Symptomatisch lassen sich Mitochondriopathien nukleärer und mitochondrialer Genese nicht voneinander abgrenzen, generell ist eine klare Zuordnung bei teils überlappender klinischer Darstellung oft schwierig.

Heute wird der Begriff Mitochondriopathien in der Regel für Erkrankungen verwendet, bei denen eine Beeinträchtigung des OXPHOS-Systems als grundlegend angenommen wird. Die genauen Pathomechanismen und resultierenden zellulären Fehlfunktionen sind dabei in den wenigsten Fällen eindeutig identifiziert. In ihrem Review zur klinischen Präsentation von syndromischen und nicht syndromischen Mitochondriopathien beschreiben Munnich und Rustin neben neuronalen Symptomen wie Hypotonie, Leukodystrophie, Hirnstammzeichen und cerebellärer Ataxie auch muskuläre, kardiale, renale, hepatische, endokrine, hämatologische, ophthalmologische und dermatologische Symptome sowie Auffälligkeiten in der Entwicklung und Dysmorphiezeichen (Munnich und Rustin 2001). Prägnant lässt sich das Bild von Dysfunktionen der Atmungskette in ihren Worten zusammenfassen: „*RC deficiency can theoretically give rise to any symptom, in any organ or tissue, at any age, with any mode of inheritance*“ (siehe Munnich und Rustin 2001, S.4).

Ataxie kann dabei Teil verschiedener Syndrome sein, gehäuft tritt sie beispielsweise bei Patienten mit Myoclonic epilepsy with ragged red fibers (MERRF) oder Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) auf, sowie bei Neuropathia-Ataxia-Retinitis-pigmentosa-Syndrom (NARP) und L Leigh-Syndrom (LS) (Hammans et al. 1993; Finsterer 2009; Leonard und

Schapira 2000). Daneben ist Ataxie auch ein relevantes Symptom in nicht-syndromischen bzw. noch nicht näher bezeichneten mitochondrialen Erkrankungen (Munnich und Rustin 2001; Pfeffer et al. 2012). Pfeffer et al. beschrieben 2012 mehrere Fälle, in denen Mutationen im Gen *MT-ATP6* klinisch das Bild einer SCA präsentierten.

### 1.3.3. *MT-ATP6*

Das Gen *MT-ATP6* ist an Position 8527 bis 9207 des humanen mitochondrialen Genoms lokalisiert, es umfasst 681bp. Flankiert wird es von den Genen *MT-ATP8* und *MT-CO3*. Im Bereich von Position 8527 bis 8572 kommt es dabei zur Überlappung von *MT-ATP8* und *MT-ATP6* bei alternativem Leseraster (Anderson et al. 1981; [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000198899](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000198899)). *MT-ATP6* besteht aus einem Exon und codiert für ein Genprodukt von 226 Aminosäuren. Dabei handelt es sich um die mitochondriale ATP Synthase Untereinheit a, Bestandteil der  $F_0F_1$ -ATP-Synthase (auch F-Typ-ATPase, im Folgenden ATP-Synthase) (<http://www.uniprot.org/uniprot/P00846>).

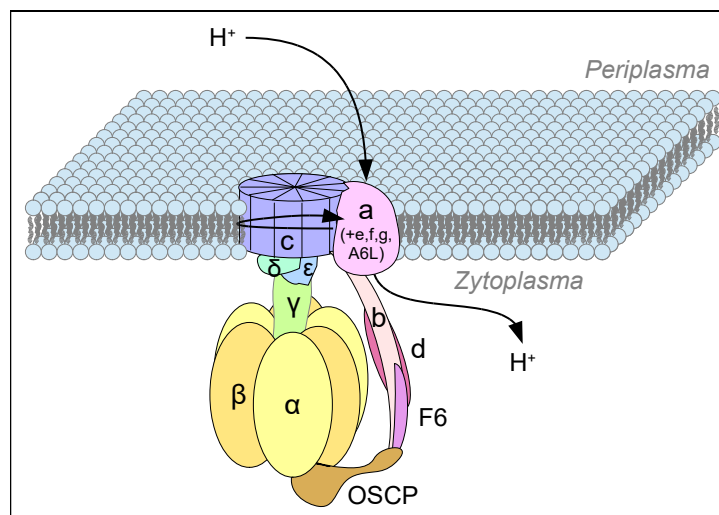
Die ATP-Synthase, auch als Komplex V bezeichnet, ist der Endpunkt der aeroben Energiegewinnung innerhalb der Mitochondrien. Sie nutzt den durch die Komplexe der Atmungskette generierten Protonengradienten. Die durch den Ausgleich des Verteilungsungleichgewichts freiwerdende Energie wird zur Synthese des Energieträgers ATP (Adenosintriphosphat) verwendet (Alberts 2015).

Die ATP-Synthase ist an der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Sie besteht aus einer hydrophoben, membranständigen  $F_0$ -Einheit und einer hydrophilen, zytosolischen  $F_1$ -Einheit. Beide Teile bestehen wiederum aus mehreren verschiedenen Untereinheiten, die teils in mehrfacher Ausführung vorliegen. Der Großteil dieser bis zu 20 Strukturelemente ist nukleär codiert, lediglich die Gene *MT-ATP6* und *MT-ATP8* (codierend für die Untereinheiten a und A6L der  $F_0$ -Einheit) liegen innerhalb der mtDNA (Anderson et al. 1981; Jonckheere et al. 2011; Xu et al. 2015). Zwischen den Untereinheiten der mitochondrialen  $F_0F_1$ -ATP-Synthase und ihrem bakteriellen Äquivalent bestehen deutliche Unterschiede, sowohl in Anzahl und Zusammensetzung als auch in der Nomenklatur der einzelnen Elemente (Xu et al. 2015).

Die  $F_1$ -Einheit besteht aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ , sie bildet die katalytische Komponente der ATP-Synthase. Dabei trägt jede der strukturell ähnlichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -

Untereinheiten eine Substratbindungsstelle, mehrere dieser Untereinheiten lagern sich zu einem  $\alpha_3\beta_3$ -Komplex zusammen. Der zentrale  $\gamma\delta\epsilon$ -Komplex bewirkt die katalytische Konformationsänderung und stellt eine Verbindung zum c-Oligomer der  $F_0$ -Einheit her, gemeinsam bilden sie funktionell den Rotor (Alberts 2015; Xu et al. 2015).

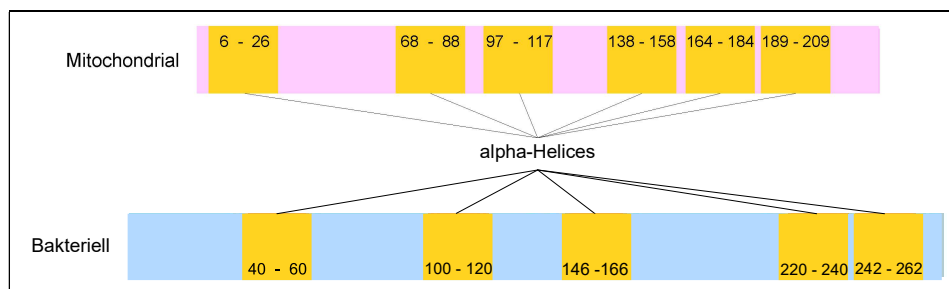
Die  $F_0$ -Einheit bildet einen turbinenartigen Protonentransporter und integriert die ATP-Synthase in die Membran. Bislang sind die Untereinheiten a, b, c, d, e, f, g, F6, OSCP und A6L identifiziert worden. Die Untereinheiten a und c dienen dem Protonentransport, die übrigen bilden gemeinsam den Stator, der den  $\alpha_3\beta_3$ -Komplex gegen die Drehbewegung der  $\gamma$ -Untereinheit fixiert (Alberts 2015; Jonckheere et al. 2011; Xu et al. 2015).



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau des mitochondrialen ATP-Synthase-Komplexes**  
(nach Jonckheere et al. 2011; Xu et al. 2015)

Die von *MT-ATP6* (mitochondrially encoded ATP synthase 6) codierte Untereinheit a besteht aus 226 Aminosäuren und umfasst sechs Transmembranhelices (TMH), die als funktionelle Domänen agieren (<http://www.uniprot.org/uniprot/P00846>). Der Aufbau der funktionell und phylogenetisch verwandten Untereinheit a der ATP-Synthase aus *E.coli* konnte bereits entschlüsselt werden, vergleichbare Daten zur exakten 3D-Konformation der mitochondrialen ATP-Synthase und ihren Untereinheiten stehen noch nicht zur Verfügung. Die Untereinheiten a der mitochondrialen und der bakteriellen ATP-Synthase unterscheiden sich in Anzahl und Anordnung ihrer Transmembrandomänen, aufgrund der entwicklungsgeschichtlichen Verwandtschaft und der vergleichbaren Rolle im Zellstoffwechsel wird jedoch eine analoge Funktion angenommen. (Xu et al. 2015). Die Strukturanalyse der bakteriellen Untereinheit a zeigte, dass die Transmembranhelices zwei Halbkanäle formen. Diese bilden jeweils

eine Verbindung vom Periplasma bzw. Zytoplasma in die Membranmitte und zum benachbarten c-Oligomer. Sie ermöglichen den Zu- und Abfluss von Protonen an die zentralen Bindungsstellen der c-Untereinheiten (Vik und Ishmukhametov 2005). Deren Protonierung führt zu einer Konformationsänderung innerhalb der c-Untereinheiten, die als Auslöser der Drehbewegung gilt, und damit sowohl für den Protonenfluss durch die ATP-Synthase als auch deren rotatorische Katalysefunktion essentiell ist.



**Abbildung 3: Anordnung der Transmembranhelices der Untereinheit a in bakterieller und mitochondrialer ATP-Synthase, Verteilung der Domänen dargestellt nach <http://www.uniprot.org>, Einträge ATP6\_HUMAN und ATP6\_ECOLI**

#### 1.3.4. Mutationen in *MT-ATP6* und zugehörige Krankheitsbilder

Mutationen im Gen *MT-ATP6* konnten bereits mit verschiedenen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht unter anderem gelten sie als verursachend für die Syndrome NARP, LS, MIBSN (mitochondrial infantile bilateral striatum necrosis) und APAO (ataxia and polyneuropathy, addult onset). Diese Syndrome sind sowohl symptomatisch als auch kausal miteinander verwandt und werden im Folgenden näher erläutert.

Das Leigh-Syndrom ist eine der häufigsten Mitochondriopathien, mit einer geschätzten Prävalenz von 1:40 000 Lebendgeburten (Rahman et al. 1996). In der Regel kommt es im Alter von 3-12 Monaten zum Krankheitseintritt, in 80% der Fälle erfolgt die Manifestation vor dem 2. Lebensjahr. Üblicherweise führt sie bei progredientem Verlauf innerhalb von 2 Jahren zum Tod (Sofou et al. 2014; Montpetit et al. 1971; Rahman et al. 1996). Seltener beschrieben wurden Formen mit späterem oder sogar adultem onset (McKelvie et al. 2012).

Erstmals beschrieben wurde das Leigh-Syndrom als Infantile Subakute Nekrotisierende Enzephalomyelopathie (Leigh 1951). Das klinische Bild der Erkrankung kann sehr variabel sein, erste Manifestationen sind häufig Fütterungsprobleme mit Saug- und Schluckstörungen, Appetitverlust und Erbrechen neben einer psychomotorischen Retardierung oder Regression und Hypotonie oder Schwäche (Montpetit et al. 1971).

Daneben können auch Somnolenz, Visus- und Hörverlust bis zur vollständigen Erblindung und Taubheit, Haltungs-, Gang- und Augenbewegungsstörungen, Dystonie, Ataxie, Krampfanfälle und Atemstörungen auftreten (Montpetit et al. 1971; Sofou et al. 2014; Leigh 1951). Als typisch gelten bilateral-symmetrischen Läsionen im Bereich der Basalganglien und des Hirnstammes (Montpetit et al. 1971; Lake et al. 2016), die Symptome lassen sich auf fokale Nekrose-Anteile im entsprechenden Areal zurückführen.

Nach den 1996 aufgestellten Diagnosekriterien liegt ein Leigh-Syndrom bei Bestehen einer neurologischen Erkrankung mit motorischer und intellektueller Entwicklungsverzögerung, Zeichen und Symptomen einer Schädigung von Hirnstamm und/oder Basalganglien, typischem histopathologischem oder bildgebendem Befund oder nachweisbar betroffenen Geschwistern, sowie erhöhten Laktatwerten in Blut und Liquor vor (Rahman et al. 1996).

Im Gegensatz zum Leigh-Syndrom existiert für das vergleichsweise seltenere NARP bislang keine einheitliche diagnostische Basis. Holt und Mitarbeiter beschrieben als erste ein von anderen mitochondrialen Myopathien abgrenzbares Krankheitsbild, die sensorische Neuropathie, Ataxie und typische Retinitis pigmentosa wurden von ihnen als Symptome identifiziert und gaben dem Syndrom seinen Namen. Darüber hinaus wurden auch Krämpfe, kognitive Entwicklungsverzögerung und neurogene Muskelschwäche beschrieben (Holt et al. 1990). Das Vorliegen aller oder mehrerer dieser Symptome gilt heute als hinweisend auf NARP (Thorburn et al. 2017).

#### **1.3.4.1. Genetik der *MT-ATP6*-assoziierten Krankheitsbilder**

Für das Leigh-Syndrom sind Mutationen in über 75 Genen bekannt, die in den meisten Fällen in Bezug zur mitochondrialen Energiegewinnung stehen. Beim LS werden 10-20% der Fälle durch mitochondriale Mutationen verursacht (Lake et al. 2016), diese Typen von LS werden unter dem Begriff ‚maternally inherited Leigh sndrome‘ (MILS) zusammengefasst (Ciafaloni et al. 1993). Innerhalb von *MT-ATP6* treten dabei die Mutationen m.8993T>G und m.8993T>C gehäuft auf, sie finden sich bei ca. 25% der MILS-Patienten (Ogawa et al. 2017).

Die Transition T zu C an Position m.8993 verursacht den Aminosäureaustausch p.L156P. Sie ist mit einer mildereren Verlaufsform assoziiert als m.8993T>G. Betroffene Patienten weisen einen verzögerten Krankheitsbeginn und einen eher chronisch-

intermittierenden Verlauf auf. Patienten mit NARP-ähnlichen Symptomen und einem an SCA erinnernden Phänotyp wurden ebenfalls beschrieben, in allen Fällen lagen dabei aber LS-typische cerebrale Läsionen vor (Santorelli et al. 1996).

Die Mutation m.8993T>G, p.L156R wird bei fast allen Fällen des NARP-Syndroms nachgewiesen. (Tatuch et al. 1992; Thorburn et al. 2017). Uziel et al. konnten 1997 demonstrieren, dass ein unterschiedlicher Grad an Heteroplasmie bei Patienten mit der mitochondrialen Variante m.8993T>G die unterschiedliche klinische Präsentation bedingt. Der Phänotyp variierte dabei mit ansteigendem Gehalt an mutierter mtDNA von adult-onset NARP im jungen Erwachsenenalter bis zu early-onset Leigh Syndrom (Uziel et al. 1997).

Weitere Syndrome, die mit dem LS Gemeinsamkeiten aufweisen, sind APAO und MIBSN. Charakteristisch für APAO ist ein ataktisches Syndrom mit Gangataxie, Dysarthrie, Dysmetrie und Augenbewegungsstörungen, begleitend findet sich eine axonale Polyneuropathie. Die Bildgebung ist entweder unauffällig oder zeigt eine cerebelläre Atrophie (Rantamäki et al. 2005; Craig et al. 2007; Castagna et al. 2007). Bei MIBSN kommt es im Vergleich zum Leigh-Syndrom zu cerebralen Läsionen geringeren Ausmaßes ohne Befall von Mittelhirn und Hirnstamm und dementsprechend abweichender klinischer Präsentation (Meirleir et al. 1995; Thyagarajan et al. 1995). Die bei APAO- und MIBSN-Patienten nachgewiesenen Mutationen, z.B. m.9185T>C (APAO) oder m.9176T>C (MIBSN) sind jedoch auch mit dem klassischen Verlauf eines LS assoziiert (Castagna et al. 2007; Dionisi-Vici et al. 1998). Ähnlich wie NARP stellen sie damit ein phänotypisch abgrenzbares Krankheitsbild bei gleichem Mutationsmechanismus dar.

### **1.3.5. Weitere Assoziationen zu *MT-ATP6***

Ataxie ist ein bekanntes Begleit- und Kardinalsymptom mitochondrialer Erkrankungen. Mutationen in *MT-ATP6* wurden bereits mehrfach mit Ataxie und ataktischen Syndromen in Verbindung gebracht (vgl. Kapitel 1.3.4.). Pfeffer und Mitarbeiter stellten 2012 einen Bezug zwischen Mutationen im *MT-ATP6* Gen und einem spinocerebellären Syndrom mit adultem Krankheitsbeginn her, das sich in seiner klinischen Präsentation von den bis dato beschriebenen Phänotypen unterscheidet. Bei den Patienten lag ein für SCA typisches Bild ohne diagnostische Hinweise auf NARP oder Symptome eines atypischen Late-Onset-Leigh-Syndroms vor.



In der von Pfeffer et al. durchgeführten Studie wurden Patienten mit klinischer Präsentation eines spinocerebellären Syndroms im Sinne einer SCA untersucht, bei denen die häufigsten Ursachen einer sekundären Ataxie (metabolische, entzündliche, neoplastische Genese) sowie passende hereditäre Ataxien (Sporadisch degenerative Ataxie, SCA 1, 2, 3, 6, 7, 12, 17, DRPLA, FA) ausgeschlossen werden konnten (Pfeffer et al. 2012).

Drei der Patienten wiesen unterschiedliche Mutationen auf (m.8993T>C, p.L156P; m.9035T>C, p.L170P; und m.9185T>C, p.L220P), die sich auch bei weiteren Betroffenen in den jeweiligen Familien identifizieren ließen und als pathogen gewertet wurden (Pfeffer et al. 2012). Die drei identifizierten Mutationen waren bereits bekannt, wurden aber zuvor mit einem abweichenden ataktischen Syndrom, LS oder NARP assoziiert (White et al. 1999; Moslemi et al. 2005; Castagna et al. 2007; Childs et al. 2007; Sikorska et al. 2009). Die von Pfeffer und Mitarbeitern beschriebenen Patienten zeichnen sich durch einen vergleichsweise späteren Krankheitsbeginn (Jugendalter bis 3. Lebensdekade), Ataxie als prominentestes Symptom, einem langsam progredienten Krankheitsverlauf und das Fehlen von kognitiven Beeinträchtigungen aus. (Pfeffer et al. 2012).

Kyotovouri und Mitarbeiter beschrieben 2016 die nicht-synonyme Variante m.8561C>G, p.P12R in der *MT-ATP6/MT-ATP8* überlappenden Region. Die betroffenen Patienten zeigten ebenfalls eine spät beginnende Ataxie. Zusätzlich wurden weitere Symptome wie eine begleitende periphere Polyneuropathie, ein Diabetes mellitus, ein hypergonadotropher Hypogonadismus und ein sensineuraler Hörverlust beobachtet. Die Bildgebung bestätigte eine cerebelläre Atrophie (Kytovuori et al. 2016).

Von Verny und Mitarbeitern wurde die bereits mit LS/MIBSN assoziierte Variante m.9176T>C, p.L217P bei einer Familie mit einer spät beginnenden Ataxie in Kombination mit einer spastischen Paraplegie und axonaler Polyneuropathie beschrieben (Verny et al. 2011).

## 1.4. Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit untersucht, ob möglicherweise pathogene *MT-ATP6*-Mutationen in einem Kollektiv adulter deutscher SCA-Patienten nachgewiesen werden können. Dabei handelt es sich um Patienten mit klinischem Verdacht auf SCA. Zuvor waren Mutationen an den Loci für SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA13, SCA14, SCA17, SCA23 und SCA28 ausgeschlossen worden.

Die erhobenen Daten sollen zur Klärung der diagnostischen Relevanz von *MT-ATP6* beitragen. Aufgrund der geringen Größe des Gens ist die Untersuchung von *MT-ATP6* einfach und kostengünstig möglich. Spielen Mutationen in *MT-ATP6* eine Rolle als Verursacher von adulter SCA, dann wäre die Integration in ein Diagnostik-Panel sinnvoll.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Betain	Sigma, Steinheim
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formamid deionisiert	Applied Biosystems, Foster City, CA
Sephadex G50	GE-Healthcare, München

#### 2.1.2. Puffer und Lösungen

##### 10x TBE-Puffer:

108g Tris-Base	Roth, Karlsruhe
55g Borsäure	Roth, Karlsruhe
40ml 0,5M EDTA pH 8,0	Roth, Karlsruhe
ad 1l H <sub>2</sub> O	

##### 1x TBE-Puffer:

10x TBE-Puffer Verdünnung 1:10	s.o.
10x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden
5x Sequenzier-Puffer	Applied Biosystems, Foster City, CA

**Gel-Ladepuffer:**

40% Sucrose	Sigma, Steinheim
0,25% Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
0,25% Xylencyanol	Merck, Darmstadt
gelöst in 1xTBE	s.o.

**Größenstandards:**

pUC9/DdeI	Institutsinterner Restriktionsverdau, Fragmentgrößen 890bp, 540bp, 426bp, 409bp, 240bp, 166bp
λ/ EcoRI-HindIII	125 (unterrepräsentiert), 565, 831, 983, 1330, 1584, 1904 und 2027 (Doppelbande), 3530, 4268, 4973 und 5148 (Doppelbande), 21226

**2.1.3. Enzyme und Nukleotide**

Desoxyribonukleotide	Promega, Madison, WI
ExoSAP	Affymetrix, Santa Clara, CA
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
DdeI	NewEngland BioLabs, Ipswich

**2.1.4. Primer**

Primer mtATP6\_F: 5'-GCCCACCATAATTACCCC-3'

Primer mtATP6\_R: 5'-GCCTAGTATGAGGAGCGTTATG-3'

**2.1.5. Kits**

QIAmp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
Straight-PCR-OLS Kit	OLS OMNI Life Science, Bremen
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA

**2.1.6. Geräte und Laborausstattung**

Eisbereiter	Manitowoc Ice, Manitowoc, WI
Elektrophoresekammer Horizon <sup>TM</sup> 58	Gibco-BRL/ Life Technologies,

Gefrierschrank	Carlsbad, CA
Gelschlitten 8x6,5cm	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Mikrowellenherd	Keutz, Reiskirchen
Photomete Ultrospec 3000pro	LG, Seoul
Pipette 10µl	Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ
Pipette 100µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 200µl	Gilson, Middleton, WI
Pipette 1000µl	Gilson, Middleton, WI
Reaktionsgefäßständer	Gilson, Middleton, WI
CCD Kamera	Brand, Wertheim
Spannungsquelle EC105	Digital Equipment Corp., Maynard, MA
Taschenkämme 10er	E-C Apparatus Corp., Milford, MA
Thermocycler: FlexCycler	Keutz, Reiskirchen
Thermodrucker Video Copy Processor P66E	Analytik Jena, Jena
UV-Lampe MacroVue UV-25	Mitsubishi, Tokyo
Vortex RS1	Hoefer, Holliston, MA
Waage EMB 1000-2	IDL, Nidderau
Heizblock Dri-Block® DB-3	Kern&Sohn, Balingen
Zentrifuge Mini Centrifuge C-1202	Techne, Cambridge
Zentrifuge Heraeus Biofuge pico	Labnet, Edison, NJ
Zentrifuge Sorvall RC 5B PLUS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA

### 2.1.7. Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platte	Merck Millipore, Billerica, MA
Eppendorf-Gefäße 2ml/ 1,5ml/ 0,5 ml	OLS OMNI Life Science, Bremen
Erlenmeyerkolben 250 ml	Fisherbrand, Schwerte
Mikrotiterplatte Deckel 1x8	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Mikrotiterplatte 3x8	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Pipettenspitzen 10µl/ 200µl/ 100 µl/ 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Thermopapier	Mitsubishi, Tokyo

## 2.1.8. Softwareprodukte und Datenbanken

SeqScape v.2.5	Applied Biosystems, Foster City, CA
Finch-TV 1.4.0	Geospiza, Seattle, WA
PolyPhen-2	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2</a>
MutationTaster2	<a href="http://www.mutationtaster.org">http://www.mutationtaster.org</a>
SIFT	<a href="http://sift.jcvi.org">http://sift.jcvi.org</a>
PROVEAN	<a href="http://provean.jcvi.org">http://provean.jcvi.org</a>
ensembl.org (Release 90 - August 2017)	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
dbSNP (Homo sapiens Annotation Release 108, GRCh38.p7)	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP</a>
MITOMAP (r20)	<a href="https://www.mitomap.org">https://www.mitomap.org</a>
NCBI	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov">https://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
UniProtKB	<a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>
OMIM®	<a href="https://www.omim.org/">https://www.omim.org/</a>

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA von 60 Patienten untersucht, die im Erwachsenenalter an einer spinocerebellären Ataxie erkrankt waren. In einer vorherigen Testung konnten die Repeat-Expansions-Loci SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17 ausgeschlossen werden. Ebenso konnten keine Punktmutationen an den Loci SCA13 (*KCNC3*), SCA14 (*PRKCG*), SCA23 (*PDYN*) und SCA28 (*AFG3L2*) nachgewiesen werden.

### 2.2.2. DNA-Extraktion

Die DNA-Gewinnung aus Probenmaterial stellt die Grundlage für die in dieser Arbeit beschriebene genetische Analyse dar. Im vorliegenden Fall erfolgte diese aus EDTA-Vollblut mithilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firm Qiagen.

#### 2.2.2.1. DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit

Dazu wurden 200µl EDTA-Blut der Patientenprobe zu 20µl Qiagen Protease in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß pipettiert, mit 200µl Buffer AL (Lysepuffer) versetzt, und 15 Sekunden lang auf dem Vortex durchmischt. Für eine effiziente Zelllyse erfolgte eine 10-minütige Inkubation im Wasserbad bei 52°C. Anschließend wurden 200µl Ethanol

(98%) zugegeben und erneut für 15 Sekunden gevortext. Ein QIAamp-Säulenfilter wurde in einem 2ml Auffangröhrchen platziert, der Ansatz darauf pipettiert, und bei 8000 Umdrehungen pro Minute (rpm) eine Minute lang zentrifugiert. Das dabei aufgefangene Eluat wurde verworfen und der Säulenfilter auf ein neues Auffangröhrchen platziert. Zur Aufreinigung der so gebundenen DNA wurde als nächster Schritt 500µl Buffer AW1 (Waschpuffer 1) auf den Säulenfilter pipettiert und bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert, nach Verwerfen des Eluats und Einsetzen in ein neues Auffangröhrchen wurden 500µl Buffer AW2 (Waschpuffer 2) aufgetragen und bei 13000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Eventuelle Reste am Rand des Säulenfilters wurden mit einer Pipette entfernt und mit dem Eluat verworfen. Der Säulenfilter wurde dann auf ein neues 1,5ml Eppendorf-Gefäß gestellt und 200µl Buffer AE (Elutionspuffer) darauf pipettiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 1300rpm für eine Minute zentrifugiert. Die bei diesem Schritt ins Eluat transferierte DNA konnte nach Bestimmung der Konzentration für die weitere Analyse verwendet werden.

#### **2.2.2.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA**

Die Bestimmung der Konzentration  $c$  der DNA wurde mittels photometrischer Extinktionsmessung vorgenommen. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz  $E = \epsilon \cdot c \cdot d$  kann aus der gemessenen Extinktion  $E$  bei einer Wellenlänge von 260nm, bei einer Schichtdicke  $d=1\text{cm}$  (Länge der Küvette), und einem angenommenen molaren Extinktionskoeffizient  $\epsilon = 0,02 \cdot (\mu\text{g/ml})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  die Konzentration der DNA-Probe berechnet werden. Dabei entspricht eine Extinktion, oder Optische Dichte  $OD=1$ , einer Konzentration von  $50\mu\text{g ds-DNA/ml}$ . (Bedson et al. 2007)

In der Regel wurde eine 1:100 Verdünnung der zu messenden DNA hergestellt und diese in eine Quarzküvette überführt. Die Messung erfolgte gegen 10mM Tris-HCl Puffer als Referenzwert. Die Konzentration der Ausgangs-DNA-Probe in  $\mu\text{g/ml}$  errechnete sich dann über die gemessene  $OD \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$   $(100) \cdot 50$ .

### **2.2.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

#### **2.2.3.1. Prinzip der PCR**

Die 1984 von Mullis/Faloona entwickelte Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dient der gezielten Vervielfältigung ausgewählter DNA-Abschnitte. Dadurch kann aus einer Vielzahl von DNA-templates der zu untersuchende Bereich

amplifiziert und der weiteren Untersuchung zugänglich gemacht werden. (Mullis und Faloona 1987) Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, bei dem die Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte – Denaturierung, Annealing, Polymerisation - vielfach wiederholt wird, um die Ausbeute zu maximieren.

1. *Denaturierung*: Die beiden komplementären Nukleinsäureketten der als Doppelhelix organisierten DNA werden hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin, und in geringerem Maße durch hydrophobe Wechselwirkung und Van-der-Waals-Kräfte zusammengehalten und stabilisiert. Unter Zuführen von Energie kommt es bei Überschreiten des Schmelzpunktes  $T_m$  zur Trennung der DNA-Stränge, dieser erste Schritt findet im PCR-Zyklus bei 94-95°C statt. (Watson und Crick 1953; Crothers et al. 1965)

2. *Annealing*: Um den ausgewählten DNA-Bereich zu amplifizieren, werden zwei synthetisierte Oligonukleotide, sogenannte „Primer“, benötigt. Die Basenabfolge dieser Oligonukleotide ist jeweils komplementär zur 3'-flankierenden Sequenz eines DNA-Templatestrangs. Das sogenannte „Annealing“, das Binden des Primers an den entsprechenden DNA-Strang, erfolgt für jeden Primer bei einer spezifischen Temperatur, die durch das Verhältnis und die Anzahl der enthaltenen Basen, und damit Wasserstoffbrückenbindungen, bestimmt ist. (Wu et al. 1991)

3. *Polymerisation/ Elongation*: Die Synthese der neuen DNA-Stränge erfolgt durch die Taq-Polymerase, eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Bei einer Temperatur von 72°C verlängert die Taq-Polymerase aus den Desoxyribonukleotiden (dNTPs) Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP) komplementär zum jeweiligen Matrizenstrang den Primer in 5'-3' Richtung. (Saiki et al. 1988)

Die so neu entstandenen Doppelstränge werden mit Beginn des nächsten Reaktionszyklus wieder denaturiert, und die neu synthetisierten Einzelstränge dienen selbst als Matrix für den nächsten Synthesesyklus. Es kommt zur exponentiellen Vermehrung des DNA-Abschnitts, bis durch Zunahme der synthetisierten DNA und Verbrauch der Edukte letztlich ein Plateau erreicht wird. Die einzelnen



Reaktionsschritte werden dabei durch das Einstellen der jeweiligen Reaktionstemperatur im kompletten Reaktionsansatz herbeigeführt.

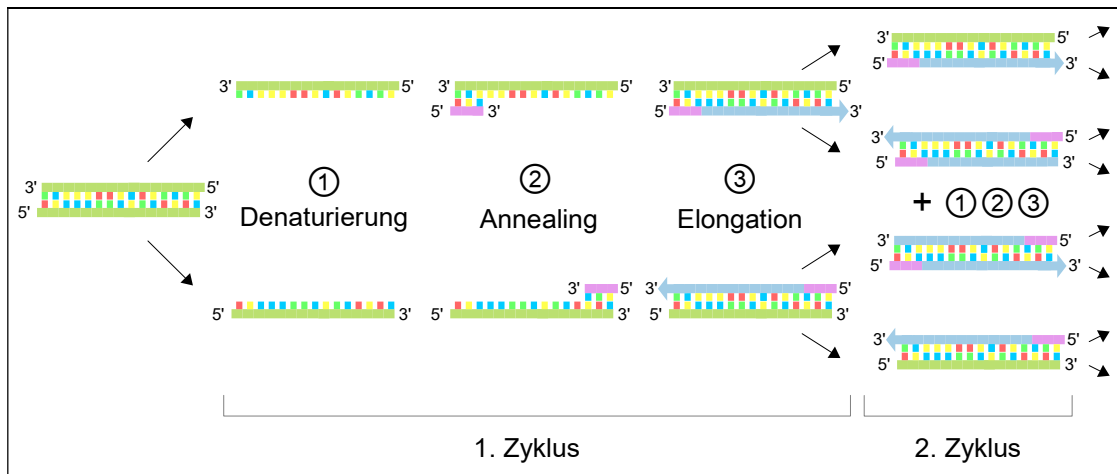


Abbildung 4: Schematische Darstellung der ersten Zyklen einer Polymerase-Kettenreaktion

### 2.2.3.2. Durchführung der PCR an *MT-ATP6*

In dieser Arbeit wurde das Gen *MT-ATP6* untersucht, das die Untereinheit a der  $F_0F_1$ -ATP-Synthase codiert. Das Gen befindet sich an Position 8527-9207 des mitochondrialen Genoms und wird direkt flankiert von codierenden Bereichen der Gene *MT-ATP8* (mitochondrially encoded ATP synthase 8) und *MT-CO3* (mitochondrially encoded cytochrome c oxidase III). (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Das Gen besteht aus nur einem Exon und konnte deshalb mit einem einzigen Primerpaar – mtATP6\_F und mtATP6\_R – amplifiziert werden.

Tabelle 5: Primersequenz

mtATP6_F: 5'-GCCCACCATAATTACCCC-3'
mtATP6_R: 5'-GCCTAGTATGAGGAGCGTTATG-3'

Das so gewonnene PCR-Produkt hat eine Größe von 953bp, der für *MT-ATP6* codierende Bereich umfasst 681bp.

Der verwendete PCR-Mix setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 6: Zusammensetzung PCR-Mix

20µl	10xPuffer
40µl	Desoxyribonukleotid-Mix (je 1,25mM)
20µl	5M Betain
3µl	Primer mtATP6_F (50pmol/µl)
3µl	Primer mtATP6_R (50pmol/µl)

1,8µl	Taq-Polymerase
112µl	H <sub>2</sub> O
200µl	

Jeweils 50µl des PCR-Mixes wurden mit 1µl Proben-DNA in ein 0,5ml Eppendorfgefäß pipettiert und vorsichtig durchmischt. Mithilfe des Thermocyclers der Firma MJ Research wurde ein Protokoll mit folgenden Reaktionsbedingungen erstellt: Nach einer initialen Denaturierungsphase von 3 Minuten bei 94°C folgte als Schritt zwei eine kürzere Denaturierungsphase von 30 Sekunden bei gleicher Temperatur. Für die 30-sekündige Annealingphase wurden die Proben auf 60°C abgekühlt, für die Synthesephase für 45 Sekunden auf 72°C erwärmt. Dieser Ablauf wurde ab Schritt zwei in 35 Zyklen wiederholt. Der letzte Zyklus endete mit einer finalen Verlängerung der Produkte bei 72°C für 2 Minuten.

## **2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese**

### **2.2.4.1. Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente können mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und dargestellt werden. Diese Methode beruht auf der Wanderung ionisierter Moleküle in einem elektrischen Feld mit einer von Feldstärke, Nettoladung und Reibung abhängigen Wanderungsgeschwindigkeit. (Zimm und Levene 1992; Berg et al. 2013)

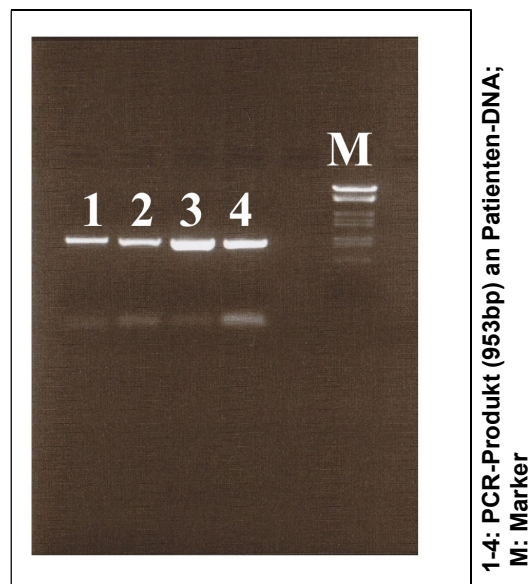
Die negative Ladung der Phosphatgruppen bewirkt eine Wanderung der DNA zur positiven Anode. Im Fall der Agarose-Gelelektrophorese dient das Medium des Agarosegels mit seiner Gitterstruktur als MolekülfILTER, in dem längere DNA-Fragmente entsprechend langsamer wandern als kürzere. (Zimm und Levene 1992; Smithies 1955)

Im Gel enthaltenes Ethidiumbromid interkaliert mit den stapelförmig angeordneten Basenpaaren und dient aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften unter UV-Licht zur Visualisierung der Nukleinsäuren. (Waring 1965)

### **2.2.4.2. Durchführung der Gelelektrophorese**

Die Herstellung des verwendeten 1%-Agarosegels erfolgte durch Zugabe von 100ml 1xTBE-Puffer zu 1g Agarose in einem Erlenmeyerkolben und Aufkochen des Ansatzes im Mikrowellenherd. Nach vollständiger Lösung des Pulvers wurden 10-15µl Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt, das Gel wurde in einem Gelschlitten mit Taschenkamm zum Aushärten gebracht.

1µl Gel-Ladepuffer und 9µl H<sub>2</sub>O wurden vermisch und mit 3µl PCR-Produkt versetzt. Die Elektrophoresekammer wurde mit dem vorbereiteten Gel und 1xTBE-Puffer bestückt, die Taschen mit den vorbereiteten PCR-Produkten beladen. In eine weitere Tasche wurde ein Größenstandard pipettiert, bei dem es sich in der Regel um pUC9/DdeI (pUC9-Plasmid verdaut mit DdeI) handelte. Anschließend wurde ein elektrisches Feld angelegt. Bei erfolgreicher PCR konnte das PCR-Produkt unter UV-Licht deutlich als fluoreszierende Bande dokumentiert und fotografisch festgehalten werden.



**Abbildung 5: Bandendarstellung in der Gelelektrophorese gegen Größenstandard  $\lambda$ / EcoRI-HindIII (Fragmentgröße PCR-Produkt 953bp, Vergleichsbanden Größenstandard 831bp und 983bp)**

### 2.2.5. Reinigung der PCR-Produkte

Vor einer Sequenzierung müssen die PCR-Produkte aufgereinigt werden. Erst die Entfernung von überzähligen Primern und dNTPs ermöglicht die spätere lineare Sequenzierung mit einem spezifischen Primer.

#### Aufreinigung mittels Säulenfilter

Es wurde das Straigth-PCR-OLS-Kit der Firma OLS OMNI Life-Sciences mit dem entsprechenden Protokoll verwendet. Dabei wurde vom gewonnenen PCR-Produkt die gewünschte Menge (<50µl) in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 500µl BB (Bindepuffer) versetzt, vermisch und auf einen Säulenfilter mit Auffangröhrchen aufgetragen. Nach 2 Minuten Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Eluat verworfen und die Säule auf ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß gesetzt. Entsprechend des zuvor

eingesetzten PCR-Produktes wurde das gleiche Volumen EB (Elutionspuffer) aufgetragen. Nach 5 Minuten Einwirkzeit wurde erneut für 1 Minute bei 8000rpm zentrifugiert und die gelöste DNA damit ins Eppendorfgefäß transferiert.

#### Enzymatische Aufreinigung mittels ExoSAP

Die enzymatische Aufreinigung erfolgte mithilfe von ExoSAP der Firma USB/Affymetrix. Dieser Enzymmix enthält Exonuklease 1 zum Abbau kurzer Oligonukleotide wie zum Beispiel überständige Primer, und Shrimp Alkalische Phosphatase, die den Abbau von überzähligen dNTPs bewirkt. Dazu wurden 0,5µl ExoSAP zu 3-4µl PCR-Produkt (je nach Bandendicke in der Gelelektrophorese) in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und der Reaktionsansatz mit H<sub>2</sub>O oder 10mM-Tris-HCl auf ein Volumen von 5µl ergänzt. Im Thermocycler wurde der Reaktionsansatz 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 85°C denaturiert.

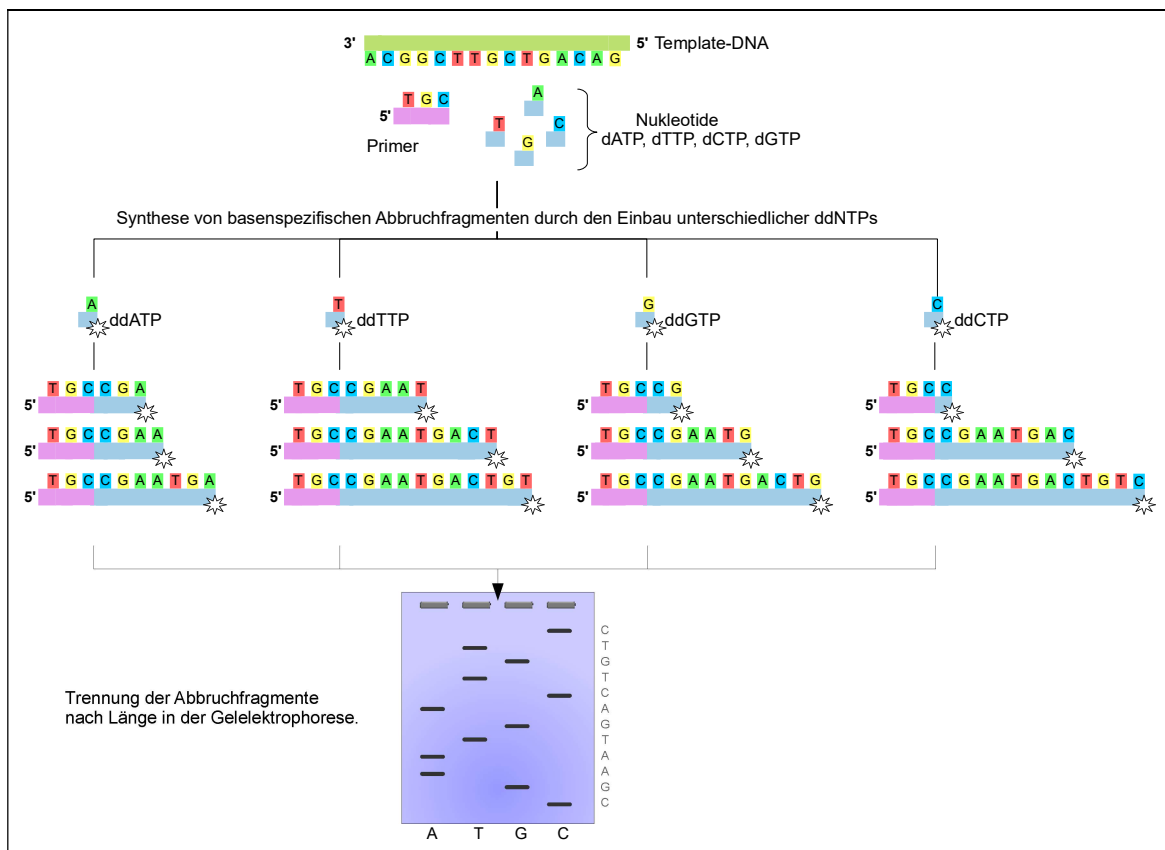
## **2.2.6. Sequenzierung**

### **2.2.6.1. Prinzip der Sanger-Sequenzierung**

Mit dem Vorgang der Sequenzierung ist es möglich, die Abfolge der einzelnen Nukleotide innerhalb eines DNA-Stranges zu ermitteln, und Abweichungen von der Vergleichssequenz zu detektieren. Die „klassische“ Sanger-Sequenzierung generiert dazu primär unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die sich im Idealfall in der Länge um genau eine Base unterscheiden. Mit Hilfe des –A/+A-Systems lässt sich die Base an der letzten Position eines Fragmentes bestimmen, und so die komplette Basensequenz entschlüsseln. (Sanger und Coulson 1975)

Das 1977 von Sanger et al. entwickelte Kettenabbruchverfahren verwendet Didesoxynukleotide (ddNTPs), und wird deshalb auch als Didesoxymethode bezeichnet. Es stellt die Grundlage für die in dieser Arbeit verwendete Kapillarsequenzierung (capillary sequencing) dar. Durch Verwendung eines einzelnen Primers wird ausschließlich der komplementäre Strang des ausgewählten DNA-Abschnittes amplifiziert, die Vervielfältigung der Matrize erfolgt nicht exponentiell sondern linear. Als Bausteine der Synthese dienen sowohl radioaktiv markierte dNTPs, als auch deren 2',3'-Didesoxyanaloga. Wird ein ddNTP bei der DNA-Synthese eingebaut, macht das Fehlen der 3'OH-Gruppe das Ausbilden einer Phosphodiesterbindung zur Verknüpfung mit einem weiteren dNTP unmöglich, es kommt zum Kettenabbruch. Bei geringer Konzentration der Analoga kommt es nur

vereinzelt zum Einbau, nach dem Zufallsprinzip entstehen Abbruchfragmente aller möglichen Längen an den Positionen, an denen die entsprechende Base codiert ist. Jedes der vier verwendeten ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) wird dabei einem separaten Reaktionsansatz zugegeben. Unter Zugabe von ddATP entstehen dann beispielsweise ausschließlich Fragmente mit Adenosin als letzter codierter Base. Trennt man diese vier Ansätze mittels Gelelektrophorese auf, so lässt sich radiografisch anhand der zunehmenden Fragmentlänge die Abfolge der Nukleotide bestimmen. (Sanger et al. 1977)



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der klassischen Sanger Sequenzierung**

Im vorliegenden Experiment wurde die modifizierte Variante der fluoreszenzmarkierten Kapillarsequenzierung genutzt. Dabei werden die Didesoxyanaloga anstatt der radioaktiven Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (dye terminator method). Da für jedes Nukleotid entsprechend der Base ein anderer Farbstoff gewählt wird, ist im Gegensatz zur klassischen Sanger Sequenzierung nur ein einziger Reaktionsansatz nötig, dem alle ddNTPs zugegeben werden. Im Sequenzierprodukt sind somit Kettenabbruchfragmente aller Nukleotide enthalten. Die Auswertung der markierten Fragmente erfolgt nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Kapillare,

durch Detektion der laserinduzierten spezifischen Emissionsspektren wird die Basensequenz bestimmt. (Prober et al. 1987; Jorgenson und Lukacs 1983)

#### **2.2.6.2. Durchführung der Sequenzierung**

Als Ausgangsprodukt für die Sequenzierung diente entweder die mit ExoSAP oder mit dem OLS-Kit aufgereinigte, amplifizierte DNA. Die verwendeten Primer wurden für die Sequenzierung auf eine Konzentration von 10pmol/µl verdünnt, in jedem Sequenzierungsansatz wurde nur jeweils ein Primer verwendet und damit nur ein DNA-Strang amplifiziert. In der Analyse der erhaltenen Elektropherogramme konnten dann die von beiden Ausgangspunkten synthetisierten komplementären Sequenzen zu einer Gesamtsequenz ergänzt werden.

Der Sequenzierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 7: Zusammensetzung Sequenzierungsansatz**

5 µl	DNA (ExoSAP-Produkt)
2 µl	Sequenzierungsprimer (10pmol/µl)
1 µl	5xPuffer
2,5 µl	ABI-Mix (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)
4,5 µl	H <sub>2</sub> O
15 µl	

Die Reagenzien wurden in ein 0,5ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und durchmischt. Mithilfe des Thermocyclers wurde ein standardisiertes Sequenzierungsprotokoll erstellt: nach einer initialen, 1-minütigen Denaturierungsphase bei 96°C folgten 25 Zyklen der Schritte Denaturierung (10 Sekunden bei 96°C), Annealing (10 Sekunden bei 60°C) und Synthese (2 Minuten bei 50°C).

#### **2.2.6.3. Aufreinigung des Sequenzierungsproduktes**

Das Sequenzierungsprodukt wurde vor der eigentlichen Sequenzanalyse noch einmal mittels Gelfiltration aufgereinigt. Dazu wurde 350-400µl Sephadex G50 (in 10mM Tris-HCl vorgequollen) in die Vertiefungen (Wells) einer 96-Well-Platte mit integrierter Fritte pipettiert und die Platte auf einer Auffangschale in eine Sorvall RC 5B PLUS Zentrifuge platziert. Um Unwucht zu vermeiden wurde eine Abfallplatte mit Wasser austariert und auf der Gegenseite platziert. Die 96-Well-Platte wurde 2 Minuten bei 2100rpm zentrifugiert und anschließend auf eine Eluatplatte gesetzt, das Zentrat in der Auffangschale verworfen. Auf die entstandenen Gelsäulen wird das Sequenzierungsprodukt

aufgetragen und die Platte mit einer neu austarierten Abfallplatte erneut 2 Minuten bei 2100rpm zentrifugiert.

Zur Analyse des so aufgereinigten Sequenzierproduktes wurden jeweils 10µl hochreines Formamid in die markierten Wells einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Das Zentrat aus der Eluatplatte wurde in die Mikrotiterplatte überführt und zur Auswertung an die Blutbank der Universität Gießen (Standort des Sequencers) übergeben.

#### **2.2.6.4. Sequenzanalyse mit SeqScape**

Zur Sequenzanalyse wurde das Analysegerät ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, zur Datenauswertung die Programme FinchTV und SeqScape\_v2.5 verwendet. Aus den in der Kapillarsequenzierung registrierten Farbsignalen wurde ein Elektropherogramm erstellt, und die Basenabfolge rekonstruiert. Nach einer ersten Kontrolle auf Verwertbarkeit und Qualität der Daten mit Hilfe des Programms FinchTV wurden die Daten in SeqScape übertragen. Im Abgleich mit der Datenbank ensembl.org erlaubt SeqScape eine genaue Analyse der Basenabfolge, den Vergleich mehrerer Elektropherogramme und die Detektion von abweichenden Signalmustern.

#### **2.2.7. Bioinformatische Analyse von Polymorphismen/ Sequence Alignment**

Datenbanken und bioinformatische Analyse-Tools erlauben eine Einstufung der sequenzanalytisch ermittelten Varianten. In den Datenbanken ensembl.org oder dbSNP lassen sich beispielsweise Informationen zu vorbeschriebenen und untersuchten Varianten (Single Nucleotide Variation, SNV) finden. (McLaren et al. 2016; Sherry et al. 2001) Solche bereits klassifizierten Loci erhalten eine „reference SNP ID number“ (rs-Nummer), unter der SNVs, die sich auf den gleichen Genort abbilden lassen, zu einem Cluster zusammengefasst werden. (NCBI. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44417/pdf/Bookshelf\\_NBK44417.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44417/pdf/Bookshelf_NBK44417.pdf), 25.07.2017.) Die rs-Nummer ermöglicht die Zuordnung einer Variante zu einem Genlocus und kann in weiterführenden Untersuchungen als Kennung (identifizier) dienen. Andere Datenbanken, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, sind MITOMAP und UniProt. UniProt verbindet Informationen aus mehrere Datenbanken und ermöglicht durch die Verknüpfung von Ergebnissen der Proteomanalyse mit genomischen Sequenzen eine Zuordnung zu funktionellen Domänen. (The UniProt Consortium 2017) MITOMAP dient der Dokumentation und Katalogisierung aller bekannten mtDNA-

Varianten. Dabei werden zum einen entsprechende Publikationen handverlesen und Sequenzvarianten mit assoziierten Informationen zu Population und Pathogenität übertragen, zum anderen werden diese Einträge durch Sequenzdaten kompletter mitochondrialer Genome, zum Beispiel aus Genbank, ergänzt. (Lott et al. 2013)

Konnte im Abgleich der Datenbanken mit den durch SeqScape erkannten non-synonymous Single Nucleotide Variations (nsSNVs) eine noch nicht vorbeschriebene Variante identifiziert werden, wurde mithilfe des Programms PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping 2) eine Einschätzung des Einflusses auf Struktur und Funktionalität des Proteins vorgenommen. PolyPhen-2 bedient sich zu diesem Zweck eines kombinierten Algorithmus aus 11 verschiedenen Elementen, die mittels maschinellen Lernens optimiert wurden, und sowohl Sequenzalignment als auch Strukturanalysen einbeziehen. (Adzhubei et al. 2010)

Sequenzalignment ist eine Methode zum Vergleich von Protein-Primärstrukturen mit gleicher oder ähnlicher Aminosäuresequenz. Dabei können entsprechende Abschnitte zum einen evolutionär als homologe Sequenzen einer ursprünglichen Ausgangssequenz verstanden werden, die durch Duplikation und unabhängige zufällige Mutation geringgradig voneinander abweichen. (Clark 2005) Zum anderen können sich Proteine oder Strukturelemente gleicher Funktion, die deshalb eine ähnliche Oberflächenstruktur benötigen, parallel entwickelt und selektiert haben – man spricht dann von evolutionärer Konvergenz. (Needleman und Wunsch 1970)

PolyPhen-2 trifft eine Auswahl aus den in der Datenbank UniRef100 hinterlegten orthologen und paralogen Sequenzen, die für eine Analyse in Frage kommen, und wertet diese mit Algorithmen des Multiple-Sequence-Alignment (MSA) aus, die ermittelten Scores fließen in die Gesamtinterpretation ein. Außerdem erfolgt ein Abgleich mit der Datenbank UniProt/UniSwiss, um eine eventuelle Beteiligung von speziellen Strukturelementen wie Enzymbindungsstellen zu erkennen. Strukturanalytisch bewertet PolyPhen-2 verschiedene Elemente, wie zum Beispiel Veränderungen der hydrophoben Eigenschaften oder der Oberflächenstruktur durch den Einbau anderer Aminosäure-Seitenketten. (Adzhubei et al. 2010)

Der errechnete Gesamtscore ermöglicht die Einschätzung der Defektwahrscheinlichkeit und des damit einhergehenden Funktionsverlustes des untersuchten Proteins.



MSA dient auch dem Analysetool SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) als Grundlage, das jedoch keine strukturanalytischen Features berücksichtigt. Die Auswertung durch SIFT beruht dabei ausschließlich auf der relativen Auftretenswahrscheinlichkeit einer Aminosäure an jeder gegebenen Position. (Kumar et al. 2009)

Der Auswertungslogarithmus des Programms PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) ermittelt mithilfe des Delta-Scores die Differenz zwischen Test- und Referenzamino-säuresequenz vor und nach Einbau der zu untersuchenden Variante. Als Referenz dient ein funktionales Sequenzhomolog, der so ermittelte Unterschied im Alignment dient der Quantifizierung der zu erwartenden Auswirkung auf die Proteinfunktion. (Choi et al. 2012)

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Studienpopulation

Die von uns untersuchten 60 Patienten wurden aufgrund einer für das Krankheitsbild Spinocerebelläre Ataxie typischen Klinik zur weiteren Abklärung an unser Institut überwiesen. Dabei handelt es sich in erster Linie um eine passende neurologische Symptompräsentation und Hinweise auf eine erbliche Komponente bei positiver Familienanamnese. Im Rahmen der Diagnostik konnten bei allen Probanden genetische Ursachen im Sinne einer SCA1-3, SCA6, SCA7, SCA13, SCA14, SCA17, SCA23 und SCA28 ausgeschlossen werden.

Die Einsendung der Proben erfolgte über einen Zeitraum von 20 Jahren mit einem Großteil der Einsender aus dem Raum Hessen und einzelnen Überweisungen aus Schleswig-Holstein, Rheinland-Pfalz, Baden-Württemberg, Bayern, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen und Hamburg. Das Geschlechterverhältnis m:w entsprach einem Ratio von 1,4. Von uns betrachtet wurden in erster Linie Patienten mit vermuteter adulter bis late-onset Manifestation. Bei Einleitung der Molekulargenetischen Diagnostik hatten alle Patienten ein Alter  $\geq 20$  Jahre, 79% (45) der Probanden waren zu diesem Zeitpunkt mehr als 40 Jahre alt. Zum Alter bei Manifestation erster Symptome liegen uns nur in 37 Fällen Informationen vor, 89% davon (33) gaben einen Symptombeginn nach dem 21. Lebensjahr an, das früheste berichtete Manifestationsalter liegt bei 15 Jahren.<sup>1</sup>

### 3.2. Sequenzanalyse

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv konnten 25 genetische Varianten identifiziert werden, 15 davon sind in der Literatur bisher nicht vorbeschrieben. Populationsspezifische Allelfrequenzen sind nur für zwei dieser Varianten in dbSNP hinterlegt (dbSNP. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?geneId=4508](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=4508), 11.11.2017.). Als Referenzgruppe für unser mitteleuropäisches Kollektiv wurde der Datensatz HapMap-CEU gewählt. In allen anderen Fällen konnte aufgrund der fehlenden

---

<sup>1</sup> Von dieser Aufstellung ausgenommen sind 3 Proben, zu denen keine Einsenderinformationen vorliegen.

Datenlage kein Vergleich vorgenommen werden. Einige Varianten haben aufgrund ihrer Lokalisation innerhalb der Sequenz einen Bezug zu wichtigen funktionellen Domänen, für einzelne Substitutionen wird eine Verknüpfung mit spezifischen Krankheitsbildern beschrieben.

**Tabelle 8: Überblick über die in dieser Arbeit identifizierten Varianten**

Chr	Pos*	c.Pos <sup>#</sup>	Basen- austausch	Funktion	AS- Austausch <sup>+</sup>	rs-Nummer	Allelfrequenz Probe	Allelfrequenz Referenz <sup>‡</sup>
m.8572	c.46	G>A	missense	p.G16S	rs28502681	G: 0,9836 A: 0,0164	unbekannt	
m.8578	c.52	C>T	missense	p.P18S	-	C: 0,9836 T: 0,0164	unbekannt	
m.8596	c.70	A>G	missense	p.I24V	-	A: 0,9836 G: 0,0164	unbekannt	
m.8610	c.84	T>C	synonymous	p.P28P	-	T: 0,9672 C: 0,0328	unbekannt	
m.8614	c.88	T>C	synonymous	p.L30L	rs878960523	T: 0,9836 C: 0,0164	unbekannt	
m.8697	c.171	G>A	synonymous	p.M57M	rs879233543	G: 0,8852 A: 0,1148	unbekannt	
m.8706	c.180	A>G	synonymous	p.M60M	-	A: 0,9836 G: 0,0164	unbekannt	
m.8764	c.238	G>A	missense	p.A80T	-	G: 0,9836 A: 0,0164	unbekannt	
m.8793	c.267	T>C	synonymous	p.P89P	-	T: 0,9836 C: 0,0164	unbekannt	
m.8811	c.285	C>T	synonymous	p.T95T	-	C: 0,9836 T: 0,0164	unbekannt	
m.8817	c.291	A>G	synonymous	p.Q97Q	rs372489053	A: 0,9672 G: 0,0328	unbekannt	
m.8818	c.292	C>T	synonymous	p.L98L	rs878853097	C: 0,9672 T: 0,0328	unbekannt	
m.8860	c.334	A>G	missense	p.T112A	rs2001031	A: 0,0328 G: 0,9672	unbekannt	
m.8901	c.375	A>G	synonymous	p.L125L	-	A: 0,9836 G: 0,0164	unbekannt	
m.8911	c.385	T>C	synonymous	p.L129L	-	T: 0,9836 C: 0,0164	unbekannt	
m.8934	c.408	C>T	synonymous	p.P136P	-	C: 0,9836 T: 0,0164	unbekannt	
m.8950	c.424	G>A	missense	p.V142I	-	G: 0,9836 A: 0,0164	unbekannt	
m.8994	c.468	G>A	synonymous	p.L156L	rs28358887	G: 0,9508 A: 0,0492	G: 0,9464 A: 0,0536	
m.9026	c.500	G>A	missense	p.G167D	-	G: 0,9836 A: 0,0164	unbekannt	
m.9055	c.529	G>A	missense	p.A177T	rs193303045	G: 0,9344 A: 0,0656	unbekannt	
m.9067	c.541	A>G	missense	p.M181V	-	A: 0,9836 G: 0,0164	unbekannt	
m.9070	c.544	T>G	missense	p.S182A	rs879190502	T: 0,9836 G: 0,0164	unbekannt	
m.9078	c.552	T>C	synonymous	p.I184I	-	T: 0,9836 C: 0,0164	unbekannt	

m.9123	c.597	G>A	synonymous	p.L199L	rs28358270	G: 0,9836 A: 0,0164	G: 0,9823 A: 0,0177
m.9150	c.624	A>G	synonymous	p.L208L	-	A: 0,9672 G: 0,0328	unbekannt

\* Position im forward strand des mitochondrialen Genoms, *MT-ATP6* entspricht Position 8527-9207 (Homo sapiens Annotation Release 108, GRCh38.p7, vgl. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4508>)

# Position im codierenden Bereich, *MT-ATP6* entspricht c.1-c.681

+ Position im Aminosäurecode des Proteins, entspricht 1-226, Abkürzungen nach IUPAC-Buchstabencode

‡ Referenzpopulation HapMap-CEU, vgl.

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_viewTable.cgi?pop=1409](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_viewTable.cgi?pop=1409)

Alle 25 Varianten wurden mittels bioinformatischer Analyse auf mögliche Auswirkungen des jeweiligen Basen- oder Aminosäureaustauschs untersucht. Dabei wurden die Programme PolyPhen-2, SIFT und PROVEAN verwendet (vgl. Kapitel 2.2.7). Der Wertebereich von PolyPhen-2 und SIFT liegt zwischen 0.00 und 1.00. Dabei entspricht ein hoher PolyPhen-2-Score einer hohen Defektwahrscheinlichkeit. SIFT hingegen bewertet den Grad der Konserviertheit über die Auftretenswahrscheinlichkeit eines AS-Austausches im MSA, ein Wert von  $\leq 0.05$  gilt als schädigend. PROVEAN definiert ein Ergebnis von  $\leq -2.5$  im Delta-Alignment-Score als ‚deleterious‘, Werte können im Bereich zwischen -18 und +5 liegen. (Adzhubei et al. 2013; Kumar et al. 2009; Choi et al. 2012)

Um Aussagen über die Auswirkungen einer genetischen Variante zu erhalten, betrachten viele Auswertungsprogramme in erster Linie die Funktionalität des codierten Proteins und Veränderungen der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur desselben. Im Falle einer synonymen Substitution ist die Analyse mit PolyPhen-2 nicht vorgesehen und dadurch kein Ergebnis angegeben, auch PROVEAN liefert für alle sSNVs automatisch einen Score von 0, und damit eine Einstufung als benigne. Der Vollständigkeit halber sind alle im Proben-Kollektiv nachgewiesenen synonymen SNVs mit aufgeführt. Im Folgenden werden die Analyseergebnisse der einzelnen Varianten beschrieben.

### 3.2.1. Bekannte Varianten (benigne)

m.8614	c.88 T>C, p.L30L	PPH2: -	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	------------------	---------	-------------------------	-------------------------

In einem Fall konnte in unserem Patientenkollektiv ein Basenaustausch T>C an Position c.88 nachgewiesen werden, unter der rs-Nummer rs878960523 ist eine entsprechende Variante vorbeschrieben. Da der Austausch synonym ist, kann bei erhaltener Aminosäuresequenz eine benigne Variante postuliert werden.

m.8697	c.171 G>A, p.M57M	PPH2: -	SIFT: 0.31 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	-------------------	---------	-------------------------	-------------------------

Der Basenaustausch c.171 G>A hat ebenfalls keinen Aminosäureaustausch zur Folge und ist unter rs879233543 in der Literatur vorbeschrieben. In unserer Stichprobe wiesen sieben Patienten eine entsprechende stumme Mutation auf. Die Auswertungstools PolyPhen-2 und PROVEAN klassifizieren die Variante als synonym und damit gutartig, auch SIFT stuft sie mit einem Score von 0.31 als neutral ein. In unserem Fall betrug die ermittelte Allelfrequenz 0,8852 für den Wildtyp (Guanin), 0,1148 für die Variante (Adenin). In dbSNP sind keine Allelfrequenzen für die entsprechende Referenzpopulation hinterlegt, ein direkter Vergleich ist damit nicht möglich. Insgesamt legen die Auftretshäufigkeit und der Erhalt der Aminosäure Methionin eine Interpretation als benigner Polymorphismus nahe.

m.8817	c.291 A>G, p.Q97Q	PPH2: -	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	-------------------	---------	-------------------------	-------------------------

In zwei Fällen ließ sich in unserem Kollektiv die unter rs372489053 vorbeschriebene Variante c.291 A>G nachweisen. Der Basenaustausch lässt die Aminosäure Glutamin und damit die an dieser Stelle vorliegende  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 3) unverändert. Die Auswertung mit PolyPhen-2, SIFT und PROVEAN ergab dementsprechend keine schädigende Auswirkung.

m.8818	c.292 C>T, p.L98L	PPH2: -	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	-------------------	---------	-------------------------	-------------------------

Die Variante c.292 C>T fand sich bei zwei Patienten unseres Kollektivs. Die Variante fällt in den codierenden Bereich für eine  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 3), ist bei Erhalt der Aminosäure Leucin an Position 98 jedoch stumm. Unter rs878853097 ist sie in dbSNP hinterlegt. Wie zu erwarten, war die bioinformatische Analyse unauffällig.

m.8860	c.334 A>G, p.T112A	PPH2: 0.000 benign	SIFT: 0.09 tolerated	PROVEAN: -3.967 Deleterious
--------	--------------------	-----------------------	-------------------------	--------------------------------

In unserer Studienpopulation wiesen alle Patienten bis auf zwei an Position c.334 die Base G auf, die in der Datenbank dbSNP als SNV mit Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin hinterlegt ist (rs2001031). In der bioinformatischen Analyse wurde die Variante trotz ihres missense Charakters und ihrer Lage innerhalb einer  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 3) von PolyPhen-2 und SIFT als unauffällig gewertet, lediglich der PROVEAN Score von -3.967 liegt im als schädigend gewerteten Bereich. In unserer Stichprobe ergab sich für an Position c.334 einer Allelfrequenz von 0,0328 für Alanin, 0,9672 für Guanin. dbSNP enthält keine Vergleichsdaten der

Referenzpopulation, MITOMAP dokumentiert allerdings in 98,52% der hinterlegten Genomsequenzen ebenfalls das Vorliegen der Variante (G). Sie ist damit weltweit häufiger als der Wildtyp (A), was sich auch in unserer Stichprobe widerspiegelt, und kann von uns als regional vorherrschender Genotyp interpretiert werden, von dem ausschließlich die beiden Probanden mit Wildtyp-Variante A an Position c.334 abweichen.

m.8994	c.468 G>A, p.L156L	PPH2: -	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	--------------------	---------	-------------------------	-------------------------

Die unter rs28358887 in der Literatur hinterlegte synonyme Variante liegt innerhalb einer  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 4), sie konnte in unserem Patientenkollektiv in drei Fällen nachgewiesen werden. Die sich daraus ergebende Allelfrequenz von G: 0,9508, A: 0,0492 ähnelt der Allelfrequenz in der Referenzbevölkerung (G: 0,9464 A: 0,0536), der Basenaustausch G>A an Position c.468 stellt am ehesten eine Normvariante dar. Bei Scores im unauffälligen Bereich werten PolyPhen-2, SIFT und PROVEAN den Austausch als gutartig. Die Variante rs28358887 wird in einer Studie zu mitochondrialen Genvarianten bei Patienten mit Adipositas (Knoll et al. 2014) zitiert, eine initial auffällige Assoziation von Adipositas und dieser Variante konnte aber in Kontroll-Kollektiven nicht bestätigt werden.

m.9070	c.544 T>G, p.S182A	PPH2: 0.225 benign	SIFT: 0.11 tolerated	PROVEAN: -0.122 neutral
--------	--------------------	-----------------------	-------------------------	----------------------------

Unter der rs-Nummer rs879190502 ist die missense Variante c.544 T>G, p.S182A vorbeschrieben. Auch einer unserer Patienten wies an dieser Position einen entsprechenden Basen- und Aminosäureaustausch auf, die Substitution der Aminosäure Alanin für Serin liegt dabei ebenfalls im Bereich einer  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 5). Die Scores aller Analysetools lagen im unbedenklichen Bereich und lassen eine Einstufung der Variante als benigner Polymorphismus zu.

m.9123	c.597 G>A, p.L199L	PPH2: -	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	--------------------	---------	-------------------------	-------------------------

Die Variante c.597 G>A, p.L199L lag in einem Fall vor, sie fällt in den Bereich der  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne TMH 6 und ist in der Literatur unter rs28358270 in dbSNP hinterlegt. Das einmalige Auftreten in unserem Patientenkollektiv entspricht einer Allelfrequenz von G: 0,9836 A: 0,0164, in der Referenzpopulation wurde eine Allelfrequenz von G: 0,9823, A: 0,0177 ermittelt. Als stumme Mutation wird die Variante in der bioinformatischen Analyse von PolyPhen-2, SIFT und PROVEAN als gutartig klassifiziert. Kumar und Mitarbeiter konnten den Basenaustausch G>A an

Position c.597 bei einem Patienten mit Leber Opticusatrophie nachweisen, werteten ihn jedoch nicht als ursächlich. (Kumar et al. 2012).

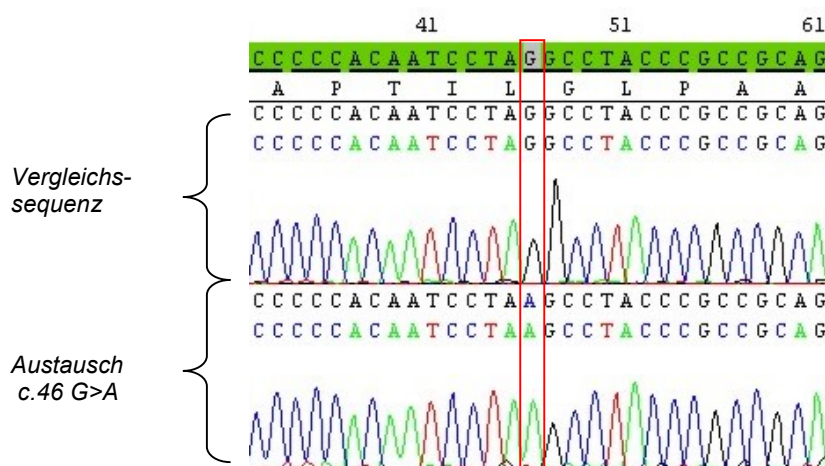
**Tabelle 9: Patienten mit bekannten benignen Varianten**

rs-Nummer	Chr Pos*	Variante	Anzahl betroffener Patienten
rs878960523	m.8614	c.88 T>C, p.L30L	1
rs879190502	m.9070	c.544 T>G, p.S182A	1
rs28358270	m.9123	c.597 G>A, p.L199L	1
rs372489053	m.8817	c.291 A>G, p.Q97Q	2
rs878853097	m.8818	c.292 C>T, p.L98L	2
rs28358887	m.8994	c.468 G>A, p.L156L	3
rs879233543	m.8697	c.171 G>A, p.M57M	7
rs2001031	m.8860	c.334 A>G, p.T112A	59

### 3.2.2. Bekannte Varianten (möglicherweise pathogen)

m.8572	c.46 G>A, p.G16S	PPH2: 0.895 possibly damaging	SIFT: 0.01 affects protein function	PROVEAN: -4.623 deleterious
--------	------------------	----------------------------------	--	--------------------------------

Die Position 8572 des mitochondrialen Genoms entspricht der Position 46 des codierenden Bereiches für *MT-ATP6*. An dieser Stelle ist ein Basenaustausch G>A vorbeschrieben (rs28502681), der eine missense Mutation mit konsekutivem Aminosäureaustausch Glycin zu Serin an Position 16 der Aminosäurekette verursacht. Assoziationen zu einem Krankheitsbild sind bisher nicht bekannt. Eine solche Variante wies auch einer unserer Patienten (Pat.ID 960.1) auf.



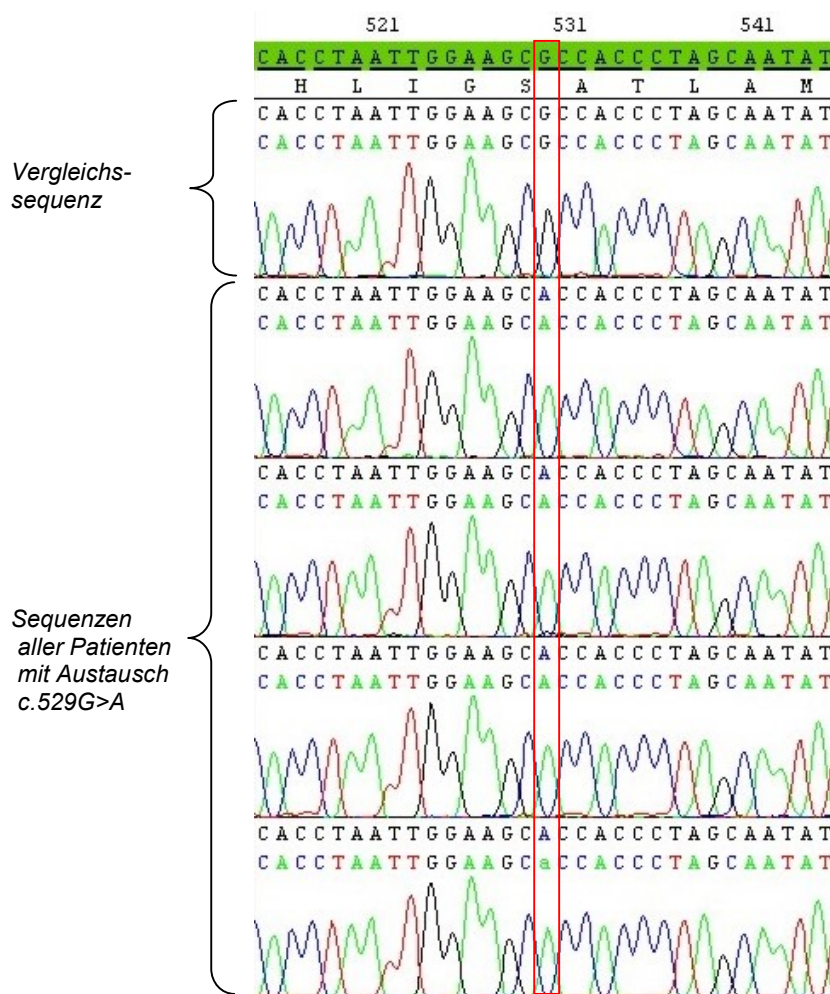
**Abbildung 7: Elektropherogramm mit der Variante c.46G>A, p.G16S**  
oben: Pat.ID 912.1 (unauffällige Vergleichssequenz), unten: Pat.ID 960.1

Die Defektwahrscheinlichkeit wird durch alle genutzten Analysetools als relevant eingestuft. Die Auswertung mit PolyPhen-2 klassifiziert den Aminosäuretausch als

„possibly damaging“, mit einem Score von 0.895. Der PROVEAN-Score von -4.623 liegt im schädlichen Bereich, ebenso deutet die geringe Austauschwahrscheinlichkeit bei SIFT= 0.01 auf eine hohe Konservierung und damit eine resultierende Funktionseinschränkung hin. Der Aminosäureaustausch liegt in einem Bereich, der im Protein als  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 1) fungiert.

m.9055	c.529 G>A, p.A177T	PPH2: 0.845 possibly damaging	SIFT: 0.02 affects protein function	PROVEAN: -2.606 deleterious
--------	--------------------	----------------------------------	--	--------------------------------

Die Variante G>A an Position c.529 verursacht den Aminosäureaustausch Alanin zu Threonin an Position 177 der Aminosäuresequenz, und ist unter der rs-Nummer rs193303045 in der dbSNP hinterlegt, sie lag bei vier unserer Patienten vor.



**Abbildung 8: Elektropherogramme mit der Variante c.529G>A, p.A177T**  
 Von oben nach unten: Pat.ID 339.1 (unauffällige Vergleichssequenz),  
 Pat.ID 553.1, Pat.ID 793.1, Pat.ID 1017.1, Pat.ID 1023.1

Der Locus der Mutation liegt innerhalb der zwischen AS-Position 164 und 184 identifizierten  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 5). SIFT sagt bei einem ermittelten Score von 0.02 einen Funktionsverlust voraus. PolyPhen-2 stuft den



Aminosäureaustausch mit einem Score von 0.845 als möglicherweise schädigend ein, der PROVEAN-Score von -2.606 entspricht ebenfalls einer Einordnung als schädhaft.

Das Vorliegen der Variante in vier Fällen entspricht einer Allelfrequenz von G: 0,9344 und A: 0,0656. Vergleichsdaten in dbSNP, die eine Einschätzung der Auftretshäufigkeit in der Referenzpopulation zulassen, waren zum Zeitpunkt der Erhebung nicht verfügbar. Daten aus MITOMAP deuten auf ein gehäuftes Vorkommen dieser Variante in Genebank (A: 0,0443) hin. 94,7% dieser Sequenzen lassen sich Individuen mit dem Haplotyp K und seinen Subtypen zuordnen, 99,5% aller in MITOMAP hinterlegten Datensätze dieses Haplotyps weisen die entsprechende Variante auf. (<https://www.mitomap.org>, Zugriff 24.02.2018) Die von uns ermittelte Allelfrequenz von 0,0656 ähnelt der von MITOMAP bereitgestellten, geschätzten Häufigkeit des Haplotyps K in Eurasischen Populationen (6%), basierend auf der Datenlage in Genebank.

L Lineages "African"			M Lineages "Asian"			N Lineages "Eurasian"		
hg	#	%	hg	#	%	hg	#	%
L3	1,854	35%	M	4,478	49%	H	8,218	29%
L0	1,244	24%	D	2,062	23%	U	3,712	13%
L2	1,235	23%	C	1,456	16%	B	3,528	12%
L1	794	15%	E	449	5%	J	2,095	7%
L4	81	2%	G	332	4%	T	1,935	7%
L5	36	1%	Q	172	2%	K	1,684	6%
L6	12	0%	Z	161	2%	A	1,252	4%
Total	5,256	100%	Total	9,110	100%	F	1,251	4%
						R	870	3%
						N	661	2%
						HV	629	2%
						I	615	2%
						V	603	2%
						W	457	2%
						X	416	1%
						P	142	1%
						Y	127	0%
						S	47	0%
						O	8	0%
						Total	28,250	100%

**Abbildung 9: Haplotypenverteilung der von MITOMAP analysierten Genebank-Genome**  
(<https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/GBFreqInfo>, Topic revision: r20 - 22 Feb 2018, Zugriff 24.02.2018)

Damit lässt sich der Austausch c.529 G>A, A177T trotz der ermittelten Scores als vermutlich normale Variante innerhalb der von uns untersuchten Stichprobe interpretieren, und wird in der Diskussion der vermutlich pathogenen Varianten nicht berücksichtigt.

### 3.2.3. Neu identifizierte Varianten (vermutlich benigne)

m.8596	c.70 A>G, p.I24V	PPH2: 0.888 possibly damaging	SIFT: 0.05 affects protein function	PROVEAN: -0.697 neutral
--------	------------------	----------------------------------	--	----------------------------

Ein Patient unseres Kollektivs wies die Variante c.70 A>G auf, die als nicht synonymer Basenaustausch den Einbau der Aminosäure Isoleucin anstelle von Valin zur Folge hat. Die missense Mutation fällt in den Bereich einer  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 1), die die Aminosäuren von Position p.6 bis p.26 umfasst. Eine mögliche Auswirkung auf die Proteinfunktion legt die Auswertung mit SIFT nahe, mit einem Score am Cutoff-Wert 0.05. Auch PolyPhen-2 wertet die Variante mit einem Score von 0.888 als „possibly damaging“. PROVEAN ermittelt einen Score von -0.697, der in die Kategorie „neutral“ fällt, und kommt damit zu einer Einstufung des Austauschs als gutartig. Bei passender klinischer Symptomatik des Patienten konnte in der weiteren Befundanalyse festgestellt werden, dass betroffene Familienmitglieder ausschließlich in der paternalen Linie auffielen. Da ein mitochondriales Vererbungsmuster vermutet wird, ist ein Zusammenhang zwischen der möglicherweise schädigenden Mutation und dem von uns untersuchten Krankheitsbild damit unwahrscheinlich.

m.8610	c.84 T>C, p.P28P	PPH2: -	SIFT: 0.05 affects protein function	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	------------------	---------	--	-------------------------

Ein Austausch T>C an Position c.84 konnte bei zwei unserer Patienten nachgewiesen werden, an diesem Genlocus ist bislang kein Basenaustausch beschrieben. Die Variante ist bei Erhalt der Aminosäure synonym. Da die Analysetools PolyPhen-2 und PROVEAN nur für die Beurteilung von nsSNVs konzipiert sind, ergibt sich für sSNVs, wie in diesem Fall, normalerweise eine Defektwahrscheinlichkeit von 0. Allerdings wertet SIFT in diesem Fall die unveränderte Aminosäure Prolin an p.28 mit einem Score von 0.05 (entspricht dem Cutoff-Wert) als funktionsbeeinflussend. Diese Diskrepanz lässt sich am ehesten damit erklären, dass die von uns ermittelte Frequenz zwar mit dem Humanen Referenzgenom identisch ist, dieses allerdings von der im MSA ermittelten Vergleichssequenz abweicht.

m.8706	c.180 A>G, p.M60M	PPH2: -	SIFT: 0.06 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	-------------------	---------	-------------------------	-------------------------

An Position c.180 konnte in einem Fall ein noch nicht vorbeschriebener Basenaustausch A>G nachgewiesen werden. Diese Variante hat keinen Aminosäureaustausch zur Folge, als synonyme Mutation ergibt die Auswertung mit PolyPhen-2 und PROVEAN automatisch eine Einordnung als benign. Auch SIFT wertet die Variante als unbedenklich.

m.8764	c.238 G>A, p.A80T	PPH2: 0.001 benign	SIFT: 0.05 affects protein function	PROVEAN: -1.221 neutral
--------	-------------------	-----------------------	--	----------------------------

In unserem Patientenkollektiv trat einmal ein Basenaustausch G>A an Position c.238 auf, eine Variante an dieser Lokalisation ist in dbSNP bislang nicht hinterlegt. Durch die Basensubstitution kommt es zum Einbau der Aminosäure Alanin anstelle von Threonin innerhalb eines für eine  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 2) codierenden Bereichs. Trotzdem klassifiziert PolyPhen-2 die missense Mutation als benignen Polymorphismus, auch der PROVEAN-Score gilt mit -1.221 als neutral. Die Vorhersage mit SIFT liegt bei einem Score von 0.05 am Grenzwert zum schädigenden Bereich.

m.8793	c.267 T>C, p.P89P	PPH2: -	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	-------------------	---------	-------------------------	-------------------------

In einem Fall trat eine synonyme Mutation an Position 89 der Aminosäuresequenz auf, dabei kam es an c.267 zum Basenaustausch T>C. Diese Variante ist noch nicht in der Literatur beschrieben. Die Auswertung mit PolyPhen-2, SIFT und PROVEAN ergab bei Erhalt der Aminosäure Prolin in allen Scores unbedenkliche Ergebnisse.

m.8811	c.285 C>T, p.T95T	PPH2: -	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	-------------------	---------	-------------------------	-------------------------

Der Austausch C>T an Position c.285 konnte bei einem Patienten nachgewiesen werden. Die Mutation ist stumm, die Aminosäuresequenz bleibt unverändert. Wie bei der vorigen Variante war auch hier die Auswertung mit PolyPhen-2, SIFT und PROVEAN unauffällig.

m.8901	c.375 A>G, p.L125L	PPH2: -	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	--------------------	---------	-------------------------	-------------------------

Der Austausch A>G an Position c.375 konnte in unserem Patientenkollektiv einmal nachgewiesen werden, er ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Die Aminosäure Leucin an p.125 bleibt dabei unverändert. Alle Analysetools werteten die synonyme Variante als benign.

m.8911	c.385 T>C, p.L129L	PPH2: -	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	--------------------	---------	-------------------------	-------------------------

Ein Patient unseres Kollektivs wies die Variante c.385 T>C, p.L129L auf. Diese Mutation ist nicht vorbeschrieben und wird als stumme Mutation erwartungsgemäß von PolyPhen-2, SIFT und PROVEAN als unbedenklich gewertet.

m.8934	c.408 C>T, p.P136P	PPH2: -	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	--------------------	---------	-------------------------	-------------------------

Bei einem Patienten lag an Position c.408 der Basenaustausch C>T vor, die synonyme Substitution führt ebenfalls zum Einbau der Aminosäure Prolin. Die Variante ist in der Literatur bislang nicht beschrieben, und wird von allen Auswertungsprogrammen als gutartig eingestuft.

m.8950	c.424 G>A, p.V142I	PPH2: 0.000 benign	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.118 neutral
--------	--------------------	-----------------------	-------------------------	---------------------------

Die missense Variante c.424 G>A konnte in einem Fall nachgewiesen werden. Der Basenaustausch verursacht den Einbau der Aminosäure Isoleucin anstelle von Valin. Diese Substitution liegt im Randbereich einer für eine  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 4) codierenden Region, alle verwendeten Analysetools werteten sie trotzdem als gutartigen Polymorphismus. Bei dem betroffenen Patienten liegt zusätzlich an Position c.500 eine weitere missense Mutation vor (s.u.), die als möglicherweise ursächlich für seine Symptomatik gelten kann.

m.9067	c.541 A>G, p.M181V	PPH2: 0.003 benign	SIFT: 0.01 affects protein function	PROVEAN: -0.967 neutral
--------	--------------------	-----------------------	--	----------------------------

Einer der Patienten wies an Position c.541 eine Substitution A>G auf, die einen Aminosäureaustausch von Methionin zu Valin verursacht. An diesem Locus ist noch keine Variante beschrieben. Die Aminosäuren von Position 164 – 184 codieren für eine  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 5), die Mutation fällt also in deren Randbereich. In der bioinformatischen Analyse wird sie von PolyPhen-2 als gutartig eingestuft. Auch PROVEAN wertet sie mit einem Score von -0.967 als neutral, lediglich die Auswertung mit SIFT wies mit einer Auftretenswahrscheinlichkeit <0.05 auf eine mögliche Einschränkung der Proteinfunktion hin.

m.9078	c.552 T>C, p.I184I	PPH2: -	SIFT: 1.00 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	--------------------	---------	-------------------------	-------------------------

Ein Basenaustausch T>C an Position c.552, wie er bei einem unserer Patienten vorliegt, ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Die Aminosäure Isoleucin bleibt erhalten, die Variante ist demzufolge synonym und die Interpretation erwartungsgemäß benigne.

m.9150	c.624 A>G, p.L208L	PPH2: -	SIFT: 0.29 tolerated	PROVEAN: 0.0 neutral
--------	--------------------	---------	-------------------------	-------------------------

In zwei Fällen ließ sich an Position c.624 der Basensequenz ein Austausch A>G nachweisen. Diese stumme Mutation ist bislang nicht vorbeschrieben und lässt die

Aminosäure Leucin unverändert. PolyPhen-2, SIFT und PROVEAN werten sie als unbedenklich.

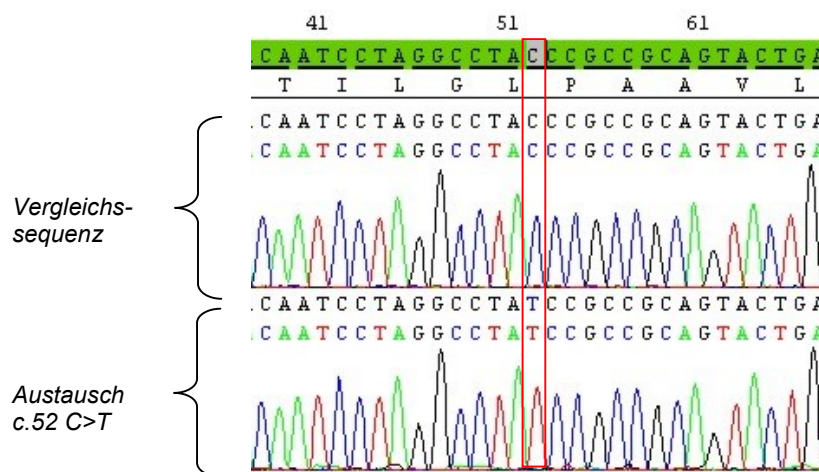
**Tabelle 10: Patienten mit neu identifizierten, vermutlich benignen Varianten**

Chr Pos*	Variante	Anzahl betroffener Patienten
m.8596	c.70 A>G, p.I24V	1
m.8706	c.180 A>G, p.M60M	1
m.8764	c.238 G>A, p.A80T	1
m.8793	c.267 T>C, p.P89P	1
m.8811	c.285C>T, p.T95T	1
m.8901	c.375 A>G, p.L125L	1
m.8911	c.385 T>C, p.L129L	1
m.8934	c.408 C>T, p.P136P	1
m.8950	c.424 G>A, p.V142I	1
m.9067	c.541 A>G, p.M181V	1
m.9078	c.552 T>C, p.I184I	1
m.8610	c.84 T>C, p.P26P	2
m.9150	c.624 A>G, p.L208L	2

### 3.2.4. Neu identifizierte Varianten (möglicherweise pathogen)

m.8578	c.52 C>T, p.P18S	PPH2: 0.999 probably damaging	SIFT: 0.04 affects protein function	PROVEAN: -6.594 deleterious
--------	------------------	----------------------------------	--	--------------------------------

Bei einem einzelnen Patienten (Pat.ID 982.1) konnte die missense Mutation p.P18S nachgewiesen werden, sie wird durch den Basenaustausch C>T an Position c.52 verursacht.

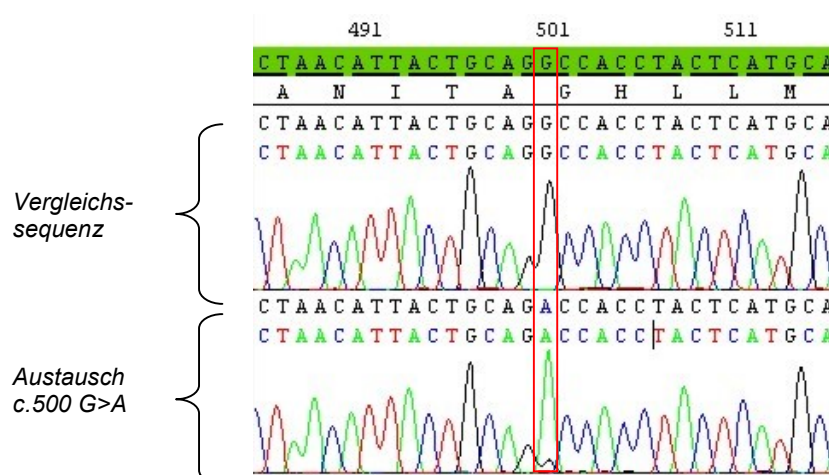


**Abbildung 10: Elektropherogramm mit der Variante c.52 C>T, p.P18S**  
oben: Pat.ID 980.1 (unauffällige Vergleichssequenz), unten: Pat.ID 982.1

In dbSNP ist an dieser Position bislang kein Polymorphismus vorbeschrieben. Die Region zwischen p.6 und p.26 der Aminosäuresequenz ist jedoch in Uniprot.org als Transmembrandomäne (TMH 1) hinterlegt, der Einbau der polaren Aminosäure Serin anstelle der in der Vergleichssequenz vorliegenden unpolaren Aminosäure Prolin könnte die korrekte Faltung der  $\alpha$ -Helix-Sekundärstruktur beeinträchtigen. Die Analyse mit PolyPhen-2 klassifiziert den Austausch mit einem Score von 0.999 als wahrscheinlich schädigend. Die von SIFT ermittelte Auftretenswahrscheinlichkeit liegt bei 0.04, was als wahrscheinlich funktionsbeeinträchtigend gewertet wird. Auch der PROVEAN-Score liegt mit -6.594 deutlich in der Kategorie ‚deleterious‘.

m.9026	c.500 G>A, p.G167D	PPH2: 1.000 probably damaging	SIFT: 0.00 affects protein function	PROVEAN: -6.275 deleterious
--------	--------------------	----------------------------------	--	--------------------------------

In einem einzigen Fall (Pat.ID 873.1) trat in unserer Untersuchung ein Basenaustausch G>A an Position c.500 auf.



**Abbildung 11: Elektropherogramm mit der Variante c.500G>A p.G167D**  
oben: Pat.ID 894.1 (unauffällige Vergleichssequenz), unten: Pat.ID 873.1

Mit dem Austausch von Asparaginsäure zum neutralen Glycin gilt diese Variante als missense Mutation, die bislang noch in keinem dbSNP reference-cluster identifiziert ist. Die Veränderung der Aminosäuresequenz liegt innerhalb einer  $\alpha$ -Helix-Transmembrandomäne (TMH 5) und stellt so ein Risiko für die funktionelle Domäne dar. In der bioinformatischen Analyse lagen die Scores aller drei verwendeten Tools eindeutig im als schädigend gewerteten Bereich. PolyPhen-2 wertet die Mutation mit einer Wahrscheinlichkeit von 1.000 als schädigend, PROVEAN ermittelt einen Score von -6.275, was einer Einstufung als ‚deleterious‘ entspricht. Der SIFT-Score von 0.00 weist auf eine deutliche Abweichung von den Vergleichssequenzen hin und sagt damit einen Einfluss auf die Proteinfunktion vorher.

Neben dem von Adenin verursachten Peak ließ sich im Elektropherogramm an Position 500 in geringerem Maße ein Guanin-Peak nachweisen. Bei ansonsten qualitativ eindeutiger Sequenzanalyse lässt sich der deutliche Signalanteil am ehesten durch Vorliegen beider Varianten im Sinne einer Heteroplasmie erklären.

### 3.2.5. Konservierung mutierter Aminosäuren

**Tabelle 11: Übersicht über die Ergebnisse der bioinformatischen Auswertung**

Chr Pos	Variante	PPH2	SIFT	PROVEAN
m.8572	c.46 G>A, p.G16S	<b>0.895</b>	<b>0.01</b>	<b>-4.623</b>
m.8578	c.52 C>T, p.P18S	<b>0.999</b>	<b>0.04</b>	<b>-6.594</b>
m.8596	c.70 A>G, p.I24V	<b>0.888</b>	<b>0.05</b>	-0.697
m.8610	c.84 T>C, p.P28P	-	<b>0.05</b>	0.0
m.8614	c.88 T>C, p.L30L	-	1.00	0.0
m.8697	c.171 G>A, p.M57M	-	0.31	0.0
m.8705	c.179 T>C, p.M60T	0.00	<b>0.05</b>	0.320
m.8706	c.180 A>G, p.M60M	-	0.06	0.0
m.8764	c.238 G>A, p.A80T	0.001	0.05	-1.221
m.8793	c.267 T>C, p.P89P	-	1.00	0.0
m.8811	c.285 C>T, p.T95T	-	1.00	0.0
m.8817	c.291 A>G, p.Q97Q	-	1.00	0.0
m.8818	c.292 C>T, p.L98L	-	1.00	0.0
m.8860	c.334 A>G, p.T112A	0.000	0.09	<b>-3.967</b>
m.8901	c.375 A>G, p.L125L	-	1.00	0.0
m.8911	c.385 T>C, p.L129L	-	1.00	0.0
m.8934	c.408 C>T, p.P136P	-	1.00	0.0
m.8950	c.424 G>A, p.V142I	0.000	1.00	0.118
m.8994	c.468 G>A, p.L156L	-	1.00	0.0
m.9026	c.500 G>A, p.G167D	<b>1.000</b>	<b>0.00</b>	<b>-6.275</b>
m.9055	c.529 G>A, p.A177T	<b>0.845</b>	<b>0.02</b>	<b>-2.606</b>
m.9067	c.541 A>G, p.M181V	0.003	<b>0.01</b>	-0.967
m.9070	c.544 T>G, p.S182A	0.225	0.11	-0.122
m.9078	c.552 T>C, p.I184I	-	1.00	0.0

m.9123	c.597 G>A, p.L199L	-	1.00	0.0
m.9150	c.624 A>G, p.L208L	-	0.29	0.0

Die bioinformatische Analyse identifizierte vier Varianten, bei denen alle Tools ein auffälliges Ergebnis erbrachten. Der Austausch c.529 G>A, p.A177T konnte dabei von der Einzelfallbeschreibung ausgenommen werden (vgl. Kapitel 3.2.2), die verbleibenden drei Varianten sind in Tabelle 12 noch einmal zusammengefasst.

**Tabelle 12: Übersicht möglicherweise pathogene Varianten**

Pat.ID	Chr Pos	Variante	Rs-Nummer	als pathogen gewertet:		
				PPH2	SIFT	PROVEAN
960.1	m.8572	c.46 G>A, p.G16S	rs28502681	✓	✓	✓
982.1	m.8578	c.52 C>T, p.P18S	-	✓	✓	✓
873.1	m.9026	c.500 G>A, p.G167D	-	✓	✓	✓

Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung der von uns bestimmten Varianten ist die direkte Darstellung im AS-Sequenz-Vergleich zwischen verschiedenen Organismen. Sie bildet die Konservierung der einzelnen Positionen und des benachbarten Bereiches ab, und ermöglicht eine Aussage, inwiefern der Grad der Konservierung mit dem Ausmaß der phylogenetischen Verwandtschaft variiert.

Die Varianten m.8572G>A, p.G16S (Pat.960.1) und m.8578C>T, p.P18S (Pat.982.1) liegen benachbart in derselben konservierten Region: Der Bereich der Transmembranhelix 1 umfasst die Aminosäuren an p.6-p.28. Trotz zunehmender Variation bei absteigender genetischer Verwandtschaft sind sowohl die Aminosäure Glycin an Position p.16, als auch die Aminosäure Prolin an p.18, in nahezu allen Vergleichssequenzen bis hin zu *G. gallus* erhalten. Einzig *M. mulatta* weist an Position p.16 die alternative Aminosäure Asparagin auf.

LFASFIAPTILGLPAAVLIILFPPL	H. sapiens	ENSP00000354632 (p.5-p.29)
LFASFIAPTILGLPAAVLIILFPPL	P. troglodytes	ENSP00000354632
LF <del>T</del> PFSAPTILNQPATIPIILFPTL	M. mulatta	ENSMUP00000031379
LFASFI <del>T</del> P <del>T</del> I <del>I</del> GLP <del>I</del> V <del>V</del> TIIMF <del>P</del> SI	R. rattus	ENSRNOP00000049769
LFASFI <del>T</del> P <del>T</del> I <del>I</del> GF <del>P</del> I <del>V</del> V <del>A</del> IIIF <del>P</del> SI	M. musculus	ENSMUSP00000080996
F <del>F</del> DQ <del>F</del> S <del>S</del> PCL <del>L</del> GL <del>I</del> PLILPSLLPAL	G. gallus	ENSGALP00000057531

**Abbildung 12: Ausschnitt aus dem AS-Sequence-Alignment im Bereich p.5-p.29. Darstellung der Konservierung von Glycin an Position p.16 und Prolin an Position p.18 (Sequenzen von [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org))**

Auch die bei Pat.873.1 vom Austausch m.9026G>A, p.G167D betroffene Aminosäure Glycin ist über alle Vergleichssequenzen konstant. Sie liegt in einem Bereich, der selbst



über die Grenze der Klasse der Säugetiere hinaus als hoch konserviert angesehen werden kann. Auch hier ist eine Transmembranhelix betroffen, TMH 5 umfasst die Aminosäuren an p.164-p.184 (vgl. Abb.13, TMH5 nicht vollständig abgebildet).

ALAVRLTANITAGHLLMHLIGSATL	H. sapiens	ENSP00000354632 (p.155-p.179)
ALAVRLTANITAGHLLMHLIGSATL	P. troglodytes	ENSP00000354632
ALAVRLTANITAGHLLIHLIGNTVL	M. mulatta	ENSMUP00000031379
ALAVRLTANITAGHLLMHLIGGATL	R. rattus	ENSRNOP00000049769
ALAVRLTANITAGHLLIHLIGGATL	M. musculus	ENSMUSP00000080996
ALGVRLTANLTAGHLLIQLISTATI	G. gallus	ENSGALP00000057531

**Abbildung 13: Ausschnitt aus dem AS-Sequence-Alignment im Bereich p.155-p.179. Darstellung von Konservierung von Glycin an Position p.167 (Sequenzen von [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org))**

### 3.2.6. Fallberichte

#### Fallbericht Patientin 960.1

Im Fall der Patientin 960.1 traten die ersten Symptome im Alter von 65 Jahren auf. Klinisch zeigte sich dabei das Bild eines progredienten, cerebellär- und sensibel-ataktischen Syndroms, weitere neurologische und radiologische Befunde wurden uns leider nicht übermittelt. Nach Konvention gilt die Familienanamnese durch den frühen Tod des Vaters als nicht aussagekräftig, die Mutter sei laut Angaben gesund gewesen.

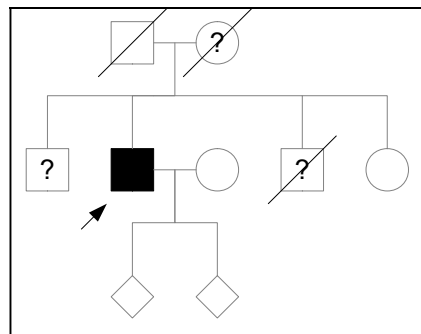
#### Fallbericht Patient 982.1

Der Patient 982.1 entwickelte im 53. Lebensjahr erste Symptome eines cerebellären Syndrom unklarer Genese, infektiologische, autoimmunologische, rheumatologische Ursachen sowie Stoffwechselstörungen wurden weitgehend ausgeschlossen. Im Verlauf zeigte sich die cerebelläre Symptomatik langsam progredient.

In der neurologischen Untersuchung fielen eine stark sakkadierte Blickfolge und ein horizontaler Blickrichtungsnystagmus auf. Die ebenfalls feststellbare Sprechstörung ließ sich als Dysarthrie bei leicht eingeschränkter orofaszialer Beweglichkeit mit ataktischem, teils überschießenden Muster und artikulatorischer Dysdiadochokinese präzisieren. Begleitend lag eine Dysphonie und eine leichtgradig skandierende Sprechweise vor. In der Gangprüfung zeigte sich ein ataktisches, unsicheres Gangbild bei anamnestisch zunehmender Sturzneigung. Der Seiltänzerengang war nur mit Unterstützung möglich, der Romberg-Stehversuch war bei Tandemstellung der Füße positiv. Der FNV ergab beidseitig einen endgradigen Intentionstremor (Zeigetremor), der KHV war leicht ataktisch, im FFV zeigten sich Dysmetrie und Ataxie. Es bestand Dysdiadochokinese beidseits. Der Patient gab leichte Konzentrationsstörungen und leichte Vergesslichkeit an.

In der Bildgebung ließ sich eine cerebelläre Atrophie nachweisen.

Familienanamnestisch berichtet der Patient von einem nicht näher abgeklärten „Zittern“ bei einem bereits verstorbenen jüngeren Bruder (†50.LJ), darüber hinaus bestanden eine nicht näher bezeichnete psychische Störung und Gleichgewichtsprobleme. Der ältere Bruder des Patienten habe bei Geburt einen Nabelschnurvorfall gehabt, im Verlauf kam es zu einem einmaligen, unklaren neurologischen Ereignis („nicht aufstehen können“). Zum Zeitpunkt der Datenerhebung bestand Dystonie. Die jüngere Schwester sei gesund, die Mutter sei im Alter von 73 Jahren an Magenkrebs verstorben, der ebenfalls bereits verstorbene Vater (†81.LJ) habe Demenz (Start im Alter von 66 J.) gehabt. Der Patient hat zwei gesunde Kinder.



**Abbildung 14: Stammbaum Patient 982.1: fraglich bestanden Symptome bei Mutter und zwei Brüdern des Indexpatienten, die jüngere Schwester war zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch symptomfrei.**

### Fallbericht Patient 873.1

Im Fall von Patient 873.1 begann eine erste Symptommanifestation um das 52. Lebensjahr, im Verlauf wurde bei Zeichen cerebellärer Dysfunktion, Dystonie und Tremor die Verdachtsdiagnose Spinocerebelläre Ataxie gestellt.

Bildmorphologisch ließ sich in der Magnetresonanztomografie des Schädels eine Kolliquationsnekrose des Temporallappens nachweisen.

In der Familienanamnese bestand im bei der Mutter des Patienten ein Tremor des Kopfes und der Hände, der Vater war klinisch unauffällig.

## 4. Diskussion

In der Klassifikation ataktischer Syndrome besteht noch kein etablierter Begriff für die von uns untersuchte und postulierte mtATP6-assoziierte Ataxie des Erwachsenenalters (SCA-MTATP6), auch wenn entsprechende Verlaufsformen bereits in mehreren Fallberichten in der Literatur zu finden sind. In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit typischer klinischer Präsentation und Verdachtsdiagnose autosomal-dominante Spinocerebelläre Ataxie untersucht, bei denen kausale Mutationen im Sinne einer SCA1, 2, 3, 6, 7, 13, 14, 17, 23 und 28 in der genetischen Diagnostik bereits ausgeschlossen werden konnten. Mittels Sequenzierung und bioinformatischer Analyse wurde versucht, Mutationen in *MT-ATP6* als Ursachen eines SCA-ähnlichen Syndroms mit adultem Krankheitsbeginn in einem deutschen Patientenkollektiv zu identifizieren.

### 4.1. Häufigkeit der SCAs

Für die Gesamtheit der autosomal-dominanten Spinocerebellären Ataxien wird eine Prävalenz von 1-5:100 000 angenommen (Bird 2016). Dabei lassen sich verhältnismäßig häufige von vergleichsweise seltenen SCAs abgrenzen. Die weltweit häufigste SCA ist SCA3 (Ruano et al. 2014), gefolgt von SCA6, SCA2 und SCA1 (Bird 2016). Alle diese SCAs gehören zur Gruppe der Poly-Q-Erkrankungen, die durch Repeatexpansionen des Trinukleotids CAG im codierenden Bereich verursacht werden. Polyglutaminerkrankungen sind die häufigste Ursache von SCA, der von ihnen verursachte Anteil wird auf ca. 65% geschätzt (Bird 2016). Bei über einem Viertel der Patienten mit SCA ist eine genetische Ursache noch gar nicht bekannt (van de Warrenburg et al. 2002). Verglichen damit ist der von Punktmutationen verursachte Anteil der SCAs gering. Es bestehen Assoziationen zu einer großen Anzahl von Genen, die für Proteine mit unterschiedlichen Funktionen codieren. Viele dieser SCAs sind weltweit nur in wenigen Familien nachgewiesen worden. Die von uns untersuchten Punktmutationen in *MT-ATP6* treten demgegenüber vergleichsweise häufig auf, potentiell pathogene Mutationen lagen in unserem Klientel in 5% der Fälle vor (vgl. Kapitel 4.2.).

### 4.2. Mutationen und Polymorphismen in *MT-ATP6*

In dieser Arbeit wurden 60 Patienten mittels Einzelgensequenzierung auf genetische Variation im Gen *MT-ATP6* gescreent. Dabei wurden insgesamt 98 Veränderungen der

Basensequenz nachgewiesen. In der Auswertung ließen sich 25 unterschiedliche Varianten identifizieren, 15 davon waren bislang noch nicht näher charakterisiert. Eine hohe Frequenz an genetischen Veränderungen in *MT-ATP6* und der gesamten mtDNA ist nicht ungewöhnlich. Als Gründe für die erhöhte Mutationsrate der mtDNA im Vergleich zum Kerngenom gelten unzulängliche Reparaturmechanismen, das Fehlen protektiver Histone und eine erhöhte Belastung durch mutagene Einflüsse wie ROS (Tuppen et al. 2010). Darüber hinaus ist *MT-ATP6* innerhalb der humanen mtDNA als Gen mit hoher Variabilität bekannt (Mishmar et al. 2003). In den von MITOMAP ausgewerteten 42616 Genbank-Genomen finden sich in *MT-ATP6* 86433 mal Veränderungen der Basensequenz. Dabei handelt es sich um 688 unterschiedliche Varianten (284 Einträge beschreiben sSNVs, 404 Einträge stehen für nicht-synonyme Substitutionen, Deletionen und Insertionen) an 538 Positionen. (<https://www.mitomap.org>, Zugriff 02.03.2018). Für 30 Mutationen besteht eine bekannte Assoziation zu Krankheitsbildern, darüber hinaus trifft MITOMAP keine Aussage zur potentiellen Pathogenität der hinterlegten Varianten, und stellt keine Informationen zu Person, Testalter und Gesundheitsstatus zur Verfügung. Außerdem muss bei der Interpretation der bereitgestellten Daten berücksichtigt werden, dass die Zusammensetzung der Datenbank nicht zwangsläufig der Allgemeinbevölkerung entspricht (Lott et al. 2013). Die Verwendung von mit spezifischer Fragestellung erhobenen Daten kann zu einer Überrepräsentation einzelner Bevölkerungsgruppen und Erkrankungen führen.

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich bei allen nachgewiesenen Varianten um Punktmutationen durch Basensubstitution, 15 davon sind synonym. In 10 Fällen kommt es durch Veränderung des genetischen Codes zum Einbau einer alternativen Aminosäure. Mithilfe unserer Analyse konnten wir 22 Varianten als am ehesten benigne Polymorphismen einstufen, für 3 Varianten wurde eine Einschätzung als potentiell pathogene Mutation vorgenommen. Damit besteht bei einem Anteil von 3/60 (5%) unserer Patienten ein Hinweis auf mitochondriale Genese ihrer Symptomatik. Pathogene Mutationen mit nukleärer Lokalisation sind dagegen vergleichsweise selten.

### **4.3. Genetik der putativen Mutationen**

Für die Bewertung der Aminosäureaustausche als möglicherweise pathogene Mutationen wurden verschiedene Scores und Wahrscheinlichkeiten herangezogen. Die

verwendeten Analysetools ermitteln für die drei Varianten p.G16S (m.8572G>A), p.P18S (m.8578C>T) und p.G167D (m.9026G>A) eine geringe Auftretenswahrscheinlichkeit und hohe bis sehr hohe Defektwahrscheinlichkeiten. Im Folgenden werden Frequenz, Konservierung, Lokalisation und mögliche zellphysiologische Einschränkungen als Indikatoren für Pathogenität näher beleuchtet.

#### **4.3.1. Frequenz und Konservierung**

Trotz der hohen Variabilität des mitochondrialen Genoms existiert für die von uns ermittelte Variante m.9026G>A, p.G167D bislang nur ein einziger Eintrag in MITOMAP (Genbank-Häufigkeit=1), es handelt sich um einen nicht näher beschriebenen Nebenbefund ohne weitere Assoziation (Li et al. 2014). An derselben Position ist in Genbank in einem Fall eine weitere Spontanmutation nachweisbar. Diese geringe Frequenz an Spontanmutationen, die klassenübergreifende Konservierung der Aminosäure Glycin an p.167, und der hohe Grad der Konservierung des gesamten benachbarten Bereiches (vgl. Abb. 13) sprechen für eine hohe funktionelle oder evolutionäre Bedeutung der Normalvariante. Für den von uns nachgewiesenen Austausch ist damit eine Interpretation als pathogen naheliegend.

Die Variante m.8572G>A, p.G16S konnte laut MITOMAP bereits in 104 Proben (Allelfrequenz A: 0,0024) mit unterschiedlichem mitochondrialen Haplotyp nachgewiesen werden. Als bereits bekannte Variante (rs28502681) wurde sie bislang noch nicht mit einem Krankheitsbild in Verbindung gebracht. Die Konservierung der Aminosäure Glycin an Position 16, und deren Lokalisation innerhalb einer funktionellen Domäne, untermauern die mögliche Pathogenität des Austauschs p.G16S. Die Häufigkeit von m.8572G>A bei dem von uns untersuchten seltenen klinischen Phänotyp spricht allerdings gegen eine direkte Assoziation im Sinne einer monokausalen Erkrankung mit genetischer Ursache. Pathogenität könnte, wie bei anderen mitochondrialen Syndromen, durch das Vorliegen weiterer Einflussfaktoren, Zweitmutationen oder interindividuell verschiedener Regulationsmechanismen zustande kommen, wie sie auch beispielsweise von Dionisi-Vici und Mitarbeitern oder Tsao und Mitarbeitern postuliert werden (Dionisi-Vici et al. 1998; Tsao et al. 2001). In diesem Sinne könnte es sich auch bei einer häufigeren Variante um einen krankheitsassoziierten Faktor handeln.

Die Variante m.8578C>T, p.P18S stellt insofern einen Sonderfall dar, als sie mit einem mitochondrialen Haplotyp in Verbindung gebracht werden kann. MITOMAP verweist auf 24 Fälle, in denen der Austausch m.8578C>T in Genbank-Genomen nachgewiesen wurde. Diese Sequenzen stammen in 79,2% von Individuen mit Haplotyp H36, 95% aller in Genbank registrierten H36-Genome weisen die Variante m.8578C>T auf. Die bei dieser Variante vom Austausch betroffene Aminosäure Prolin an Position 18 ist, wie im Sequence-Alignment dargestellt, hoch konserviert. Neben der bioinformatischen Analyse liefert der Grad der Konservierung einen direkten Hinweis auf Pathogenität von p.P18S. Die Zuordnung zu einem Haplotyp schließt dabei eine Interpretation der Variante als krankheitsverursachend nicht aus. Unter Berücksichtigung der Populationsgenetik lassen sich durch Zuordnung eines Genoms zu einer Referenzgruppe komplexe Interaktionen erklären, wie sie beispielsweise im Falle der Hereditären Leber-Opticusneuropathie vorliegen (Hudson et al. 2007). Patienten mit den mtDNA Varianten m.11778G>A und m.14484T>C haben ein erhöhtes Risiko zu erblinden, wenn sie den mitochondrialen Haplotypen J aufweisen, Patienten mit anderem Haplotyp haben ein vergleichsweise niedrigeres Risiko. Mögliche Assoziationen von einzelnen Haplotypen zu Krankheitsbildern werden beispielsweise auch für Alzheimer Demenz (Shoffner et al. 1993; Wang und Brinton 2016), Lewy-Körperchen-Demenz (Chinnery et al. 2000), und verminderte Spermienmotilität (Ruiz-Pesini et al. 2000) vermutet. Bei fehlenden Angaben zur regionalen oder populationsspezifischen Häufigkeit von H36 kann es sich bei der Häufung von m.8578C>T um ein koinzidentielles Vorkommen handeln, es lässt sich aber auch eine Assoziation des gesamten Haplotyps zu dem entsprechenden Krankheitsbild nicht ausschließen.

Alle von uns untersuchten Proben wurden primär zu Diagnose- und Forschungszwecken extern gewonnen. Daher waren für uns interessante und relevante Fakten lückenhaft und teils nicht eruierbar. Insbesondere die Familienanamnese und Befunde der Bildgebung waren nur eingeschränkt verfügbar. Für keinen unserer Indexpatienten erfolgte eine genetische Diagnostik der Familienangehörigen. Insofern können die von uns identifizierten Varianten m.8572G>A, m.8578C>T und m.9026G>A nicht unzweifelhaft mit dem klinischen Phänotyp ihrer Träger in Verbindung gebracht werden, sondern bedürfen der Bestätigung. Bei der geringen Prävalenz des von uns beschriebenen Krankheitsbildes ist ein zufälliger Beleg durch übereinstimmende Fallberichte allerdings fraglich.

### 4.3.2. Lokalisation und funktionelle Relevanz

Alle in dieser Arbeit als potentiell pathogen identifizierten Varianten liegen im Bereich von Transmembrandomänen. Diese Regionen codieren für eine charakteristische Aminosäuresequenz, deren räumliche Anordnung zur Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix-Konformation führt. Dabei haben die Aminosäureseitenketten Einfluss auf die Struktur der  $\alpha$ -Helix (Barlow und Thornton 1988), die durch Einbau einer Aminosäure mit anderen Seitenketteneigenschaften verändert werden kann. Die genaue Rolle der einzelnen TMH in der humanen Untereinheit a der ATP-Synthase wurde noch nicht belegt. Neben der Verankerung der hydrophoben Untereinheit a in der Membran wird analog zur bakteriellen Untereinheit a eine Beteiligung an Protonentransport und damit der rotatorischen Katalyse vermutet (Xu et al. 2015). Für die bakterielle ATP-Synthase wird eine räumliche und funktionelle Kopplung der Untereinheiten a und c postuliert (Vik und Ishmukhametov 2005), deren  $\alpha$ -Helices gemeinsam die Protonenkanäle bilden. Auch wenn sich die strukturellen Erkenntnisse nicht direkt übertragen lassen, ist eine vergleichbare Funktion der  $\alpha$ -Helices in mitochondrialen Untereinheiten naheliegend (Xu et al. 2015). Veränderungen im Aufbau der  $\alpha$ -Helices könnten somit sowohl die Kanalfunktion, als auch die Interaktion der ATP-Synthase-Untereinheiten beeinträchtigen. Da die ATP-Synthase als Endschrift der Atmungskette fungiert, bedeutet der Wegfall dieser Reaktion einen Wegfall der aeroben Energieversorgung der Zelle und ein vermindertes Vorkommen des Energieträgers ATP.

Zwei der von uns identifizierten Mutationen (m.8572G>A, m.8578C>T) fallen in den Bereich der ersten Transmembranhelix (TMH 1). Die Variante m.8572G>A verursacht den Austausch p.G16S, die polare Aminosäure Glycin wird durch die ebenfalls polare Aminosäure Serin ersetzt. Auch die Variante m.8578C>T hat den Einbau der Aminosäure Serin zur Folge, in diesem Fall wird allerdings die hydrophobe/ unpolare Aminosäure Prolin an Position p.18 (p.P18S) ersetzt. Die von Kytovuori und Mitarbeitern als Ursache für ein ataktisches Syndrom mit Neuropathie, Diabetes mellitus und hypergonadotrophem Hypogonadismus identifizierte Mutation m.8561G>C, p.P12R liegt in derselben Domäne. Sie beeinträchtigt nachweisbar die ATP-Synthase, der Einbau der mutierten Untereinheit führt zu einem geringeren ATP-Gehalt der untersuchten Zellen (Kytovuori et al. 2016).

Im Falle von m.9026G>A hat die Änderung der Sequenz den Verlust einer polaren Glycin-Seitenkette zur Folge. An Position p.167 kommt es stattdessen zum Einbau der sauren Aminosäure Asparaginat (p.G167D) in TMH 5. Die Mutation m.9035T>C, p.L170P betrifft ebenfalls den Bereich dieser funktionellen Domäne, sie wurde als Ursache eines progredienten ataktischen Syndroms mit kognitiver Beeinträchtigung identifiziert. Sikorska und Kollegen konnten im Cybrid-Versuch nachweisen, dass sie einen verminderten ATP-Gehalt bei Einschränkungen der ATP-Synthase-Aktivität verursacht. Gleichzeitig bestanden erhöhte ROS-Werte mit resultierender Hochregulation der Kompensationsmechanismen, und eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress (Sikorska et al. 2009).

	10			20		30		40		50
MNENL	FASFI	APTILGLPAA	VLIILF	PPLL	IPTSKYLINN	RLITTQQWLI				
	60		70		80		90		100	
KLTSKQMMTM	HNTKGRT	WSL	MLVSLIIFIA	TTNLLGLLPH	SFTPTTQLSM					
	110		120		130		140		150	
NLAMAIPLWA	GTVIMGF	FRSK	IKNALAHFLP	QGTPTPLIPM	LVIIETISLL					
	160		170		180		190		200	
IQPMALAVRL	TANITAGHLL	MHLIGSATLA	MSTINLPSTL	IIFTILILLT						
	210		220							
ILEIAVALIQ	AYVFTLLVSL	YLHDNT								

**Abbildung 15: Lokalisation und Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Helices in der mitochondrialen  $F_0$ -Untereinheit a.** Die Eigenschaften der helixbildenden Aminosäuren sind durch farbliche Markierung gekennzeichnet (gelb: unpolar, grün: polar, rot: sauer, blau: basisch)  
Pfeile: Die von uns identifizierten Aminosäureaustausche p.G16S, p.P18S und p.G167D  
Sterne: Variante p.P12R (Kytovuori et al. 2016) und p.L170P (Sikorska et al. 2009)

Analog zu diesen Ergebnissen wäre auch für die von uns ermittelten Ergebnisse ein Pathomechanismus durch OXPHOS-Fehlfunktion, energetische Minderversorgung und erhöhte Belastung durch oxidativen Stress möglich, wie er für andere Mitochondriopathien angenommen wird.

## 4.4. Komplex-V-Defizienz

Erkrankungen, deren Entstehung auf der Dys- oder Minderfunktion der ATP-Synthase beruht, können unter dem Begriff Komplex-V-Defizienz zusammengefasst werden. Dabei stellt das von uns beschriebene Spinocerebelläre Syndrom nur einen von mehreren bekannten Phänotypen dar.

### 4.4.1. Die *MT-ATP6*-assoziierte Ataxie des Erwachsenenalters

Mutationen in *MT-ATP6* mit dem zugehörigen klinischen Erscheinungsbild einer Spinocerebellären Ataxie mit adultem Krankheitsbeginn sind bereits bekannt. Craig und



Mitarbeiter beschrieben m.8993T>C, p.L156P als Ursache eines adulten Spinocerebellären Syndroms mit Gangataxie und Dysarthrie, in der betroffenen Familie traten auch Beeinträchtigungen der sensorischen Leitungsbahnen auf (Craig et al. 2007). Rantamäki und Mitarbeiter wiesen bei Patienten mit dieser Variante ebenfalls eine langsam progrediente Ataxie mit adultem Krankheitsbeginn und begleitender Polyneuropathie im Sinne einer APAO nach (Rantamäki et al. 2005). Tsao und Mitarbeiter werteten den Austausch m.8993T>G, p.L156R als Ursache des Phänotyps einer Familie mit milder Gangataxie, teilweise begleitet von Dysarthrie, kognitiver Beeinträchtigung, Dystonie und sensineuralem Hörverlust (Tsao et al. 2001). Auch für die Variante m.9185T>C, p.L220P konnten in einer Familie Fälle einer Manifestation als adult-onset Ataxie mit sensomotorischer Neuropathie nachgewiesen werden (Castagna et al. 2007). Pfeffer und Mitarbeiter identifizierten dieselbe Mutation in einer Familie, bei der neben einer Ataxie mit Beginn im Erwachsenenalter Dysarthrie, Augenbewegungsstörungen und axonale Neuropathie mit Muskelschwund vorlagen (Pfeffer et al. 2012). In einer weiteren Familie konnten sie die Variante m.9035T>C, p.L170P als ursächlich für Fälle eines adulten Ataxiesyndroms identifizieren.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden drei nicht-synonyme Mutationen in *MT-ATP6* als mögliche Ursachen eines SCA-ähnlichen Syndroms ermittelt. Die Variante m.8572G>A, p.G16S lag bei einer Patientin (960.1) mit einem progredienten, cerebellär- und sensibel-ataktischen Syndrom vor, zur Manifestation kam es im Alter von 65 Jahren. Bei Patient 982.1 konnte die Variante m.8578C>T, p.18S nachgewiesen werden, klinisch waren eine Ataxie, Dysarthrie und Augenbewegungsstörungen auffällig. Die Erkrankung verlief bei Beginn nach dem 50. Lebensjahr langsam progredient. Auch bei Patient 873.1, bei dem die Variante m.9026G>A, p.G167D vorlag, bestanden nachweisbaren Zeichen der cerebellären Dysfunktion und ein Erkrankungsbeginn im Erwachsenenalter.

Damit liegt bereits für 7 unterschiedliche Mutationen in *MT-ATP6* eine vermutete oder nachgewiesene Assoziation zu einem Spinocerebellären Syndrom mit adultem Beginn vor, die sich unter dem Begriff der *MT-ATP6*-assoziierten Ataxie des Erwachsenenalters (SCA-MTATP6) zusammenfassen lassen. Vergleichbar ist diese Datenlage beispielsweise mit SCA35, bei der bislang 5 Punktmutationen im Gen *TGM6* in 6 nicht verwandten Familien als Ursache nachgewiesen werden konnten (Guo et al. 2014).

#### 4.4.2. SCA-MTATP6 im Kontext von MILS, NARP, APAO und MIBSN

Ein Zusammenhang verschiedener Erkrankungen mit Komplex-V-Defizienz bei Überschneidungen im Mutationsmechanismus ist für MILS und APAO, beziehungsweise MILS und MIBSN, bereits bekannt. Die Variante m.8993T>G, p.L156R ist in erster Linie als Ursache von MILS/NARP bekannt. In den von Craig und Mitarbeitern sowie Rantamäki und Mitarbeitern beschriebenen Familien manifestiert sie dagegen als Ataxie mit Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter und begleitender Neuropathie, der entsprechende Verlauf wird als APAO bezeichnet (Craig et al. 2007; Rantamäki et al. 2005). Darüber hinaus konnten Castagna und Mitarbeiter auch für Patienten mit der Variante m.9185T>C, p.L220P sowohl Fälle von APAO, als auch mit LS vereinbare, multisystemische Präsentationen nachweisen (Castagna et al. 2007). Die von Thyagarajan und Mitarbeitern als Ursache von MIBSN beschriebene Mutation m.9176T>C, p.L217P konnte beispielsweise von Dionisi-Vici und Mitarbeitern in kausalen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf eines fulminanten LS gebracht werden (Thyagarajan et al. 1995; Dionisi-Vici et al. 1998). Damit lassen sich sowohl APAO als auch MIBSN als abweichende Verlaufsformen dem MILS zuordnen, wie es im Falle von NARP bereits üblich ist. Während jedoch die unterschiedlich starke klinische Ausprägung von NARP und MILS durch den Grad der Heteroplasmie erklärt werden kann, ist eine Zuordnung bei APAO und MIBSN nicht eindeutig nachweisbar, so dass weitere Einflussfaktoren vermutet werden können (Dionisi-Vici et al. 1998; Craig et al. 2007).

Auch die *MT-ATP6*-assoziierte Ataxie des Erwachsenenalters lässt sich so in das Spektrum der Komplex-V-Defizienz eingliedern, sie schließt die Untergruppe der als APAO zusammengefassten Fälle mit ein. Die von uns berichteten Varianten sind in der Literatur bislang nicht bekannt. Für andere der unter 4.4.1 beschriebenen Mutationen bestehen neben dem SCA-Phänotyp allerdings entsprechende Assoziationen zu Komplex-V-Defizienz-Syndromen.

m.8993T>C, p.L156P gilt als eine der Hauptursachen für MILS, und als kausal für LS mit mildem Verlauf (Lake et al. 2016). Sie kann allerdings auch den bei Tsao und Mitarbeitern beschriebenen alternativen Phänotyp mit Gangataxie, Dysarthrie, Dystonie, kognitiver Beeinträchtigung und sensineuralem Hörverlust ohne die für LS klassischen klinischen und radiologischen Befunde verursachen (Tsao et al. 2001). Die

von Pfeffer und Mitarbeitern bei Patienten mit SCA-ähnlicher Präsentation nachgewiesene Variante m.9185T>C, p.L220P wurde bereits als kausal für late-onset LS in variabler Ausprägung beschrieben. Moslemi und Mitarbeiter brachten sie mit einem Fall von MILS mit normaler frühkindlicher Entwicklung, akutem Krankheitsbeginn und mildem, fraglich Coenzym-Q-sensitivem reversiblen Verlauf bei einem 7jährigen Jungen in Verbindung (Moslemi et al. 2005). Bei einer von Castagna und Mitarbeitern untersuchten Familie verursachte m.9185T>C, p.L220P teils ein ataktisch-neuropathisches Bild mit variablem onset, teils konnte die Diagnose eines LS im Grundschulalter gestellt werden (Castagna et al. 2007). Auch Childs und Mitarbeiter konnten mehrere Fälle von Patienten berichten, die mit dieser Variante ein late-onset-LS entwickelten. Andere von ihnen untersuchte Mutationsträger entwickelten dagegen eine mit kindlichen Gedeihstörungen und zunehmender kognitiver Beeinträchtigung assoziierte Ataxie und Neuropathie mit Beginn im Kindesalter (Childs et al. 2007).

Wie für MIBSN und die Untergruppe APAO scheint auch für SCA-MTATP6 eine Abhängigkeit vom Heteroplasmiegrad als Ursache der unterschiedlichen Krankheitsschwere unwahrscheinlich (Childs et al. 2007; Pfeffer et al. 2012). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse erfolgte an Lymphozyten, eine gesonderte Untersuchung zum Gehalt mutierter mtDNA in unterschiedlichen Geweben wurde von uns nicht durchgeführt, der Heteroplasmiegehalt unserer Proben konnte aber in der Auswertung der Sequenzanalyse abgeschätzt werden. Die Varianten m.8572G>A, p.G16S (Pat.ID 960.1) m.8578C>T, p.18S (Pat.ID 982.1) stellten sich im Elektropherogramm als Homoplasmie dar, bei Patient 873.1 liefert der nachweisbare Guanin-Peak an Position c.500 (m.9026) einen Hinweis auf das heteroplasmische Vorliegen der Variante m.9026G>A, p.G167D. Der Anteil der Wildtyp-mtDNA lässt sich durch Ausmessen des Signals auf ~10% schätzen.

Bei Homoplasmie für m.9185T>C wiesen die von Childs beschriebenen Fälle unterschiedliche Verläufe auf. Pfeffer und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie eine vergleichbare Mutationslast in Lymphozyten und Muskelgewebe nachweisen, was auf eine anzunehmende Homogenität in der Heteroplasmieverteilung hinweist (Pfeffer et al. 2012). Schwankende Heteroplasmiewerte mit einem höheren Gehalt an mutierter DNA in betroffenen Geweben scheinen daher nicht ursächlich für die Variabilität der klinischen Präsentation zu sein. Darüber hinaus lag in den untersuchten Geweben ein Heteroplasmiegehalt von teils 99% vor. Proben aus Nervengewebe wurden nicht

analysiert, die Annahme, dass eine primär neuronale Symptomatik sich durch eine noch höhere Mutationslast innerhalb des Nervengewebes bei entsprechend hohem Schwellenwert erklärt, ist allerdings unwahrscheinlich.

Eine andere Erklärung für eine Betonung neuronaler Symptome könnte die Gewebespezifität (tissue specificity) sein, wie sie beispielsweise von Crooks und Mitarbeitern für ISCU-Myopathie nachgewiesen werden konnte. Bei dieser Erkrankung entsteht das gewebsspezifische Krankheitsbild der Myopathie durch verstärktes Fehlspllicing bei Interaktionen mit dem muskelspezifischen Transkriptionsfaktor MyoD (Crooks et al. 2012). Eine solche expressionsabhängige Beeinflussung könnte durchaus zu zellspezifischer Pathogenität eines ansonsten ubiquitär vorliegenden Proteins führen.

Zusammengefasst können alle oben genannten Erkrankungen als verschiedene Ausprägungen einer zugrunde liegenden Fehlfunktion verstanden werden. Bislang wurden primär ataktische Verlaufsformen bei vorbekanntem Mutationsmechanismus den jeweiligen Syndromen zugeordnet und als atypische Präsentation in den Symptomkatalog aufgenommen. Es wäre aber auch denkbar, sie aus differentialdiagnostischen Gründen zu einem eigenen Syndrom zusammenzufassen und abzugrenzen.

#### **4.4.3. Empfehlung: *MT-ATP6* in der genetischen Testung und Diagnostik**

Mutationen in *MT-ATP6* konnten bereits mehrfach als Ursache eines Krankheitsbildes belegt werden, das klassische Symptome wie Gangataxie, Dysarthrie, Dysmetrie, Nystagmus, cerebelläre Atrophie und adulten Krankheitsbeginn aufweist und mit dem Erscheinungsbild einer Heredoataxie vereinbar ist. Bei bislang unzureichender Datenlage ließ sich keine konkrete Aussage dazu treffen, wie häufig solche SCA-MTATP6-Fälle im klinischen Alltag sind. Anhand der in unserem Patientenkollektiv ermittelten Frequenz nehmen wir allerdings an, dass sie, ausgehend von den hier präsentierten Daten, bis zu 5% der ungeklärten SCA-Fälle in Deutschland ausmachen können. Insbesondere die erhöhte Mutationsrate der mtDNA, die Schlüsselfunktion der ATP-Synthase im Zellstoffwechsel, und die komplexen Beziehungen zwischen Syndromen der Komplex-V-Defizienz lassen eine hohe Dunkelziffer wahrscheinlich erscheinen. *MT-ATP6* besteht aus einem einzigen Exon, die Testung mittels Einzelgensequenzierung ist bei der geringen Größe einfach, schnell und kostengünstig

möglich. Sie sollte bevorzugt in Erwägung gezogen werden, wenn Hinweise auf einen mitochondrialen Erbgang vorliegen. Durch Phänomene wie Heteroplasmie und Schwellenwert-Effekt und bei unvollständiger Familienanamnese kann die maternale Transmission allerdings als autosomal-dominante Vererbung maskiert sein (Brusse et al. 2007).

Aufgrund ihres weltweit häufigeren Auftretens sollten in der genetischen Testung zuerst die Polyglutaminerkrankungen SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 (bei Retinopathie), SCA8 und FRDA ausgeschlossen werden (Bird 2016). Anschließend empfehlen wir die Analyse von *MT-ATP6*, wenn in Befundlage und Anamnese kein dezidiert Hinweis auf eine der vergleichsweise selteneren Erkrankungen, wie SCA10, SCA12, SCA14, SCA17, SCA27 oder DRPLA (Brusse et al. 2007) besteht. Das Vorliegen einer Chorea weist beispielsweise auf SCA17 oder DRPLA hin (Bird 2016), SCA31 tritt gehäuft unter japanischen, SCA10 bei lateinamerikanischen Patienten auf (Hirano et al. 2009; Matsuura et al. 2000); entsprechende Diagnostik sollte in diesen Fällen vorgezogen werden. Das Screening auf andere Punktmutationen sollte erst nach Abschluss dieser Stufendiagnostik erfolgen.

Die Diagnosestellung bei Patienten mit SCA-MTATP6 ermöglicht es, den Betroffenen eine genetische Beratung anzubieten. Informationen zu Ursache, Symptomen, möglichem Krankheitsverlauf, Vererbung und Therapieoptionen erlauben den Patienten, die bestmöglichen Entscheidungen in Bezug auf die weitere Lebensplanung zu treffen, und Unterstützung wie Selbsthilfegruppen oder Rehabilitationsmaßnahmen wahrzunehmen.

#### **4.5. Ausblick**

Die Berücksichtigung von Mutationen in *MT-ATP6* erweitert das Spektrum in der Differentialdiagnostik der Heredoataxien. Die Untersuchung auf weitere Mutationen mit nachweislicher Kausalität würde zum einen die *MT-ATP6*-assoziierte Ataxie des Erwachsenenalters als Syndrom bestätigen, zum anderen einen Hinweis auf deren Prävalenz geben. Der genaue Pathomechanismus der meisten Mutationen, auch der von uns nachgewiesenen, ist noch nicht belegt. Eine Entschlüsselung desselben, genau wie die Klärung weiterer Einflussfaktoren, könnte ein besseres Krankheitsverständnis und einen Ansatzpunkt zur Entwicklung spezieller Therapieoptionen ermöglichen. Die Wirksamkeit medikamentöser Therapie der Heredoataxien ist bislang nur in seltenen

Fällen eindeutig belegt (Bird 2016), und ist aktueller Gegenstand der Forschung (Zesiewicz et al. 2018). Im Falle von Belastung durch ROS in SCA-MTATP6 wäre beispielsweise eine antioxidative Therapie denkbar (Sikorska et al. 2009).

## 5. Zusammenfassung

Ataxie ist ein bekanntes Begleitsymptom mitochondrialer Syndrome, die üblicherweise multisystemisch manifestieren. Bekannte Loci betreffen auch das Gen *MT-ATP6*, das für die Untereinheit a der mitochondrialen F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase codiert. Diese ist als Komplex V essentiell an der zellulären Energieversorgung beteiligt ist. Bei Erkrankungen mit kausaler Mutation in *MT-ATP6* besteht normalerweise ein komplexer Phänotyp. Ataxie konnte allerdings bereits in mehreren Fällen als Leitsymptom beschrieben werden, die klinische Präsentation dieser Patienten entspricht am ehesten dem Bild einer Spinocerebellären Ataxie mit adulter Manifestation. Mutationen in *MT-ATP6* kommen daher als Ursache bislang nicht diagnostizierbarer Fälle von SCA in Frage.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kollektiv deutscher Patienten mit Verdachtsdiagnose SCA und einem Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter nach vorherigem Ausschluss diverser Ataxie-Loci auf Mutationen in *MT-ATP6* untersucht. Dabei wurden mittels Einzelgensequenzierung Varianten der Basensequenz in *MT-ATP6* ermittelt, und unter Zuhilfenahme von bioinformatischen Analysetools eine Einschätzung der Pathogenität vorgenommen.

In der untersuchten Stichprobe wiesen 5% der Probanden potentiell pathogene Mutationen in *MT-ATP6* auf. Alle diese Varianten (m.8572G>A, p.G16S; m.8578C>T, p.P18S; m.9026G>A, p.G167D) betreffen hochkonservierte, funktionelle Domänen. Die neu identifizierten Varianten wurden bislang weder mit adulter SCA, noch mit anderen Erkrankungen assoziiert.

Die in dieser Arbeit neu identifizierten Fälle untermauern die Existenz eines abgrenzbaren Phänotyps innerhalb der Erkrankungen mit Komplex-V-Defizienz, die *MT-ATP6*-assoziierte Spinocerebelläre Ataxie des Erwachsenenalters (SCA-MTATP6). Daher erscheint die Berücksichtigung von *MT-ATP6* im Rahmen der SCA-Diagnostik sinnvoll. In Anbetracht der Hinweise auf ein gehäuftes Auftreten empfiehlt sich der Ausschluss von SCA-MTATP6 nach erfolgter Testung auf SCA-assoziierte Trinukleotid-Expansions-Loci.

## 6. Summary

Ataxia is known as an accompanying symptom of multisystemic mitochondrial disorders, some of which have been attributed to mutations in the *MT-ATP6* gene. This gene encodes subunit a of the mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP Synthase, also known as complex V, a vital component of cellular energy production. While diseases caused by mutations in *MT-ATP6* usually present with a complex phenotype, ataxia has been described as the leading symptom in several cases. Those patients showed a phenotype consistent with clinical presentation of late-onset spinocerebellar ataxia. Thus, mutations in *MT-ATP6* should be considered as a plausible explanation in cases of previously undiagnosed SCA.

In this study, German patients suspected of adult-onset SCA with inconclusive genetic testing were screened for mutations in *MT-ATP6*. Nucleic acid variations were identified through single gene sequencing, and their pathogenicity assessed via bioinformatic analysis.

5% of patients in the selected cohort showed potentially damaging mutations in *MT-ATP6*. In all cases, the identified substitutions (m.8572G>A, p.G16S; m.8578C>T, p.P18S; m.9026G>A, p.G167D) were located in highly conserved regions encoding functional domains, and had not yet been associated with SCA or other diseases.

These findings support the existence of a distinct phenotype, an *MT-ATP6*-associated spinocerebellar ataxia with adult onset (SCA-MTATP6) within the spectrum of diseases with complex V deficiency. Inclusion of this gene in the diagnostic process of SCA is advisable; due to the frequent occurrence of SCA-linked mutations in *MT-ATP6*, testing for SCA-MTATP6 should be considered after negative screening at trinucleotide repeat loci.



## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Organisation des mitochondrialen Genoms .....	10
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des mitochondrialen ATP-Synthase-Komplexes .....	15
Abbildung 3: Anordnung der Transmembranhelices der Untereinheit a .....	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung Polymerase-Kettenreaktion .....	27
Abbildung 5: Bandendarstellung in der Gelelektrophorese .....	29
Abbildung 6: Schematische Darstellung der klassischen Sanger Sequenzierung.....	31
Abbildung 7: Elektropherogramm mit der Variante c.46G>A, p.G16S .....	41
Abbildung 8: Elektropherogramme mit der Variante c.529G>A, p.A177T .....	42
Abbildung 9: Haplotypenverteilung MITOMAP .....	43
Abbildung 10: Elektropherogramm mit der Variante c.52 C>T, p.P18S.....	47
Abbildung 11: Elektropherogramm mit der Variante c.500G>A p.G167D.....	48
Abbildung 12: Ausschnitt aus dem AS-Sequence-Alignment .....	50
im Bereich p.5-p.29	
Abbildung 13: Ausschnitt aus dem AS-Sequence-Alignment .....	51
im Bereich p.155-p.179	
Abbildung 14: Stammbaum Patient 982.1 .....	52
Abbildung 15: Lokalisation und Aminosäuresequenz der $\alpha$ -Helices in der.....	58
mitochondrialen F <sub>0</sub> - Untereinheit a	

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über Symptome im Rahmen von ataktischen Erkrankungen.....	1
Tabelle 2: Sekundäre Ataxie und ihre Ursachen.....	2
Tabelle 3: Übersicht über die Autosomal-Dominanten Spinocerebellären Ataxien (SCAs) .....	7
Tabelle 4: Übersicht über die wichtigsten X-chromosomal vererbten cerebellären Syndrome .....	9
Tabelle 5: Primersequenz .....	27
Tabelle 6: Zusammensetzung PCR-Mix .....	27
Tabelle 7: Zusammensetzung Sequenzieransatz .....	32
Tabelle 8: Überblick über die in dieser Arbeit identifizierten Varianten.....	37
Tabelle 9: Patienten mit bekannten benignen Varianten.....	41
Tabelle 10: Patienten mit neu identifizierten, vermutlich benignen Varianten.....	47
Tabelle 11: Übersicht über die Ergebnisse der bioinformatischen Auswertung.....	49
Tabelle 12: Übersicht möglicherweise pathogene Varianten.....	50

## 9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3D	3-dimensional
A	Nukleobase Adenin/ Nukleotid Adenosinmonophosphat/ Aminosäure Alanin
Abb.	Abbildung
ADCA	Autosomal-dominante Cerebelläre Ataxie
Anti-GAD	Glutamatdecarboxylase-Antikörper
Anti-TG	Thyreoglobulin-Antikörper
APAO	Ataxie und Polyneuropathie mit adultem Onset
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C	Nukleobase Cytosin/ Nukleotid Cytidinmonophosphat/ Aminosäure Cystein
c.	Position in der Basensequenz der codierenden Region
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DRLPA	Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie
ds	Doppelstrang
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EA	Episodische Ataxie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
etc.	et cetera
FA	Friedreich Ataxie
FFV	Finger-Folge-Versuch
FNV	Finger-Nase-Versuch
g	Gramm
G	Nukleobase Guanin/ Nukleotid Guanosinmonophosphat/ Aminosäure Glycin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
Hg.	Herausgeber
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
i.d.R	in der Regel
J	Jahr

kb	Kilobase
KHV	Knien-Hacke-Versuch
LE	low electroendosmosis
LJ	Lebensjahr
LS	Leigh Syndrom
M	mol/l
m.	Position in der Basensequenz der mtDNA
MIBSN	Mitochondriale Infantile Bilaterale Striatale Nekrose
MILS	Maternal vererbtes Leigh-Syndrom
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomografie
MSA	Multi Sequenz Alignment
mtDNA	mitochondriale DNA
MT-ATP6	mitochondrially encoded ATP synthase 6
NARP	Neuropathie, Ataxie, Retinitis Pigmentosa
nDNA	nukläre DNA
nm	nanometer
ns	nicht-synonym
OH	Hydroxygruppe
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
p	p-Arm des Chromosoms
p.	Position in der AS-Sequenz des Proteins
Pat.ID	Patienten Identifikation
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pmol	picomol
PolyPhen	Polymorphism Phenotyping (Analysetool)
Poly-Q	Polyglutamin
PROVEAN	Protein Variation Effect Analyzer
q	q-Arm des Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Radikale Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
rs	reference SNP ID
S	Sedimentationskoeffizient
s	synonym
s.	siehe
S.	Seite
s.o./ s.u.	siehe oben/ siehe unten
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SCAR	Spinocerebelläre Ataxie, autosomal-rezessiv
SIFT	Sortin Intolerant from Tolerant (Analysetool)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNV	Single Nucleotide Variant
T	Nukleobase Thymin/ Nukleotid Thymidinmonophosphat/ Aminosäure Threonin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer

T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt
TMH	Transmembranelix
tRNA	Transfer-RNA
U	Nukleobase Uracil / Nukleotid Uridinmonophosphat
u.a.	unter anderem
UTR	Untranslatierte Region
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
VZV	Varizella Zoster Virus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## 10. Literaturverzeichnis

- Adzhubei IA, Jordan DM, Sunyaev SR (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current protocols in human genetics* **0 7**, Unit7.20.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* **7** (4), 248–249.
- Akbar U; Ashizawa T (2015). Ataxia. *Neurologic clinics* **33** (1), 225–248.
- Alberts B (2015). Molecular biology of the cell. 6. edition. New York: Garland Science.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290** (5806), 457–465.
- Banfi S, Servadio A, Chung MY, et al. (1994). Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia. *Nature genetics* **7** (4), 513–520.
- Barlow DJ; Thornton JM (1988). Helix geometry in proteins. *Journal of Molecular Biology* **201** (3), 601–619.
- Bedson P, Parkes H, Saunders GC, Upton S (2007). Analytical molecular biology. Quality and validation. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2013). Stryer Biochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bird TD (2016). Hereditary Ataxia Overview. In: Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora J. H. Bean, Heather C. Mefford et al. (Hg.) (1993-2017): GeneReviews®. Seattle (WA).
- Brown WM, George M, Wilson AC (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76** (4), 1967–1971.
- Brusse E, Maat-Kievit JA, van Swieten JC (2007). Diagnosis and management of early- and late-onset cerebellar ataxia. *Clinical genetics* **71** (1), 12–24.
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, et al. (1996). Friedreich's ataxia. Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271** (5254), 1423–1427.

- Castagna AE, Addis J, McInnes RR, et al. (2007). Late onset Leigh syndrome and ataxia due to a T to C mutation at bp 9,185 of mitochondrial DNA. *American journal of medical genetics. Part A* **143A** (8), 808–816.
- Childs A-M, Hutchin T, Pysden K, et al. (2007). Variable phenotype including Leigh syndrome with a 9185TC mutation in the MTATP6 gene. *Neuropediatrics* **38** (6), 313–316.
- Chinnery PF; Hudson G (2013). Mitochondrial genetics. *British medical bulletin* **106**, 135–159.
- Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, et al. (2000). Mitochondrial DNA haplogroups and susceptibility to AD and dementia with Lewy bodies. *Neurology* **55** (2), 302–304.
- Choi K-D; Choi J-H (2016). Episodic Ataxias. Clinical and Genetic Features. *Journal of movement disorders* **9** (3), 129–135.
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, et al. (2012). Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PloS one* **7** (10), e46688.
- Chung MY, Ranum LP, Duvick LA, et al. (1993). Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nature genetics* **5** (3), 254–258.
- Ciafaloni E, Santorelli FM, Shanske S, et al. (1993). Maternally inherited Leigh syndrome. *The Journal of pediatrics* **122** (3), 419–422.
- Clark DP (2005). Molecular biology. Understanding the genetic revolution. Boston: Elsevier Academic Press.
- Craig K, Elliott HR, Keers SM, et al. (2007). Episodic ataxia and hemiplegia caused by the 8993T-C mitochondrial DNA mutation. *Journal of medical genetics* **44** (12), 797–799.
- Cree LM, Samuels DC, Sousa Lopes SC de, et al. (2008). A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nature genetics* **40** (2), 249–254.
- Crooks DR, Jeong SY, Tong W-H, et al. (2012). Tissue specificity of a human mitochondrial disease: differentiation-enhanced mis-splicing of the Fe-S scaffold gene

ISCU renders patient cells more sensitive to oxidative stress in ISCU myopathy. *The Journal of biological chemistry* **287** (48), 40119–40130.

Crothers DM, Kallenbach NR, Zimm BH (1965). The melting transition of low-molecular-weight DNA. Theory and experiment. *Journal of Molecular Biology* **11** (4), 802–820.

David G, Abbas N, Stevanin G, et al. (1997). Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature genetics* **17** (1), 65–70.

dbSNP (2017). SNP linked to Gene (geneID:4508) Via Contig Annotation. Online verfügbar unter [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?geneId=4508](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=4508), zuletzt geprüft am 11.11.2017.

de Bot ST, Willemsen, Michel A. A. P., Vermeer S, et al. (2012). Reviewing the genetic causes of spastic-ataxias. *Neurology* **79** (14), 1507–1514.

Delatycki MB, Williamson R, Forrest SM (2000). Friedreich ataxia. An overview. *Journal of medical genetics* **37** (1), 1–8.

Dionisi-Vici C, Seneca S, Zeviani M, et al. (1998). Fulminant Leigh syndrome and sudden unexpected death in a family with the T9176C mutation of the mitochondrial ATPase 6 gene. *Journal of inherited metabolic disease* **21** (1), 2–8.

Embirucu EK, Martyn ML, Schlesinger D, et al. (2009). Autosomal recessive ataxias. 20 types, and counting. *Arquivos de neuro-psiquiatria* **67** (4), 1143–1156.

Epplen C, Epplen JT, Frank G, et al. (1997). Differential stability of the (GAA)<sub>n</sub> tract in the Friedreich ataxia (STM7) gene. *Human Genetics* **99** (6), 834–836.

Finsterer J (2009). Mitochondrial Ataxias. *Canadian Journal of Neurological Sciences* **36** (5), 543–553.

Fogel BL; Perlman S (2007). Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. *The Lancet. Neurology* **6** (3), 245–257.

Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability. Resolution of the Sherman paradox. *Cell* **67** (6), 1047–1058.



- Germain DP (2006). General aspects of X-linked diseases. In: Atul Mehta, Michael Beck und Gere Sunder-Plassmann (Hg.) (2006): *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, et al. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77** (11), 6715–6719.
- Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, et al. (2012). Mitochondrial DNA and disease. *The Journal of Pathology* **226** (2), 274–286.
- Guo Y-C, Lin J-J, Liao Y-C, et al. (2014). Spinocerebellar ataxia 35. Novel mutations in TGM6 with clinical and genetic characterization. *Neurology* **83** (17), 1554–1561.
- Hacke, Werner (Hg.) (2016). *Neurologie*. 14., überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).
- Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M, et al. (1993). The mitochondrial DNA transfer RNA(Lys)A--G(8344) mutation and the syndrome of myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF). Relationship of clinical phenotype to proportion of mutant mitochondrial DNA. *Brain : a journal of neurology* **116** (Pt 3), 617–632.
- Hanauer A, Chery M, Fujita R, et al. (1990). The Friedreich ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-q21 by mapping of tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *American journal of human genetics* **46** (1), 133–137.
- Harding AE (1982). The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the 'the Drew family of Walworth'. *Brain : a journal of neurology* **105** (Pt 1), 1–28.
- Harding AE (1983). Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *The Lancet* **321** (8334), 1151–1155.
- Harman D (1956). Aging. A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* **11** (3), 298–300.
- Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, et al. (2002). Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *American journal of human genetics* **70** (5), 1152–1171.

- Hirano R, Takashima H, Okubo R, et al. (2009). Clinical and genetic characterization of 16q-linked autosomal dominant spinocerebellar ataxia in South Kyushu, Japan. *Journal of human genetics* **54** (7), 377–381.
- Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, et al. (1999). Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nature genetics* **23** (4), 391–392.
- Holt IJ, Harding AE, Petty RK, et al. (1990). A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *American journal of human genetics* **46** (3), 428–433.
- Houlden H, Johnson J, Gardner-Thorpe C, et al. (2007). Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nature genetics* **39** (12), 1434–1436.
- Hudson G, Carelli V, Spruijt L, et al. (2007). Clinical Expression of Leber Hereditary Optic Neuropathy Is Affected by the Mitochondrial DNA–Haplogroup Background. *American journal of human genetics* **81** (2), 228–233.
- Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, et al. (2006). Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nature genetics* **38** (2), 184–190.
- Jen JC, Graves TD, Hess EJ, et al. (2007). Primary episodic ataxias. Diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain : a journal of neurology* **130** (Pt 10), 2484–2493.
- Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT (2011). Mitochondrial ATP synthase. Architecture, function and pathology. *Journal of inherited metabolic disease* **35** (2), 211–225.
- Jorgenson J; Lukacs K (1983). Capillary zone electrophoresis. *Science* **222** (4621), 266–272.
- Kim S-J, Xiao J, Wan J, et al. (2017). Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism. *The Journal of physiology* **595** (21), 6613–6621.
- Knight MA, Hernandez D, Diede SJ, et al. (2008). A duplication at chromosome 11q12.2-11q12.3 is associated with spinocerebellar ataxia type 20. *Human Molecular Genetics* **17** (24), 3847–3853.

- Knoll N, Jarick I, Volckmar A-L, et al. (2014). Mitochondrial DNA variants in obesity. *PloS one* **9** (5), e94882.
- Kumar M, Kaur P, Saxena R, et al. (2012). Clinical characterization and mitochondrial DNA sequence variations in Leber hereditary optic neuropathy. *Molecular vision* **18**, 2687–2699.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols* **4** (7), 1073–1081.
- Kytovuori L, Lipponen J, Rusanen H, et al. (2016). A novel mutation m.8561CG in MT-ATP6/8 causing a mitochondrial syndrome with ataxia, peripheral neuropathy, diabetes mellitus, and hypergonadotropic hypogonadism. *Journal of neurology* **263** (11), 2188–2195.
- Lake NJ, Compton AG, Rahman S, et al. (2016). Leigh syndrome. One disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of neurology* **79** (2), 190–203.
- Leigh D (1951). Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **14** (3), 216.
- Leonard JV; Schapira AH (2000). Mitochondrial respiratory chain disorders I. Mitochondrial DNA defects. *The Lancet* **355** (9200), 299–304.
- Lexikon der Neurowissenschaft. Ataxie (2000). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/ataxie/1004>, zuletzt geprüft am 20.10.2017.
- Li S, Besenbacher S, Li Y, et al. (2014). Variation and association to diabetes in 2000 full mtDNA sequences mined from an exome study in a Danish population. *European journal of human genetics* **22** (8), 1040–1045.
- Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O, et al. (2013). mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Current protocols in bioinformatics* **44**, 1.23.1-26.
- Margolis RL (2003). Dominant spinocerebellar ataxias. A molecular approach to classification, diagnosis, pathogenesis and the future. *Expert review of molecular diagnostics* **3** (6), 715–732.

- Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, et al. (2000). Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nature genetics* **26** (2), 191–194.
- Matsuyama Z, Kawakami H, Maruyama H, et al. (1997). Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). *Human Molecular Genetics* **6** (8), 1283–1287.
- McKelvie P, Infeld B, Marotta R, et al. (2012). Late-adult onset Leigh syndrome. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **19** (2), 195–202.
- McLaren W, Gil L, Hunt SE, et al. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome biology* **17** (1), 122.
- Meirleir L de, Seneca S, Lissens W, et al. (1995). Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene. *Pediatric neurology* **13** (3), 242–246.
- Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, et al. (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100** (1), 171–176.
- Montpetit VJA, Andermann F, Carpenter S, et al. (1971). Subacute necrotizing encephalomyelopathy. A review and a study of two families. *Brain : a journal of neurology* **94** (1), 1–30.
- Moslemi A-R, Darin N, Tulinius M, et al. (2005). Two new mutations in the MTATP6 gene associated with Leigh syndrome. *Neuropediatrics* **36** (05), 314–318.
- Mullis KB; Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335–350.
- Munnich A; Rustin P (2001). Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *American journal of medical genetics* **106** (1), 4–17.
- Nachbauer W, Eigentler A, Boesch S (2015). Acquired ataxias. The clinical spectrum, diagnosis and management. *Journal of neurology* **262** (5), 1385–1393.
- Nave R, Ginestroni A, Giannelli M, et al. (2008). Brain structural damage in Friedreich's ataxia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **79** (1), 82–85.

NCBI (2005-). SNP FAQ Archive: Clustered RefSNPs (rs) and Other Data Computed in House. Bethesda (MD):National Center for Biotechnology Information (US. Online verfügbar unter

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44417/pdf/Bookshelf\\_NBK44417.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44417/pdf/Bookshelf_NBK44417.pdf), zuletzt geprüft am 25.07.2017.

Needleman SB; Wunsch CD (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* **48** (3), 443–453.

Neupert W (2015). A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. *Journal of Molecular Biology* **427** (6 Pt A), 1135–1158.

Ogawa E, Shimura M, Fushimi T, et al. (2017). Clinical validity of biochemical and molecular analysis in diagnosing Leigh syndrome. A study of 106 Japanese patients. *Journal of inherited metabolic disease* **40** (5), 685–693.

Orr HT, Chung MY, Banfi S, et al. (1993). Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature genetics* **4** (3), 221–226.

Orr HT; Zoghbi HY (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annual review of neuroscience* **30**, 575–621.

Pfeffer G, Blakely EL, Alston CL, et al. (2012). Adult-onset spinocerebellar ataxia syndromes due to MTATP6 mutations. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **83** (9), 883–886.

Prober J, Trainor G, Dam R, et al. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238** (4825), 336–341.

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (2017). Begründet von Pschyrembel, W. Unter Mitarbeit der Pschyrembel-Redaktion. 267th updated edition. Berlin: De Gruyter.

Rahman S, Blok RB, Dahl HH, et al. (1996). Leigh syndrome. Clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annals of neurology* **39** (3), 343–351.

Rantamäki MT, Soini HK, Finnilä SM, et al. (2005). Adult-onset ataxia and polyneuropathy caused by mitochondrial 8993T--C mutation. *Annals of neurology* **58** (2), 337–340.

- Ruano L, Melo C, Silva MC, et al. (2014). The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia. A systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology* **42** (3), 174–183.
- Ruiz-Pesini E, Lapeña A-C, Díez-Sánchez C, et al. (2000). Human mtDNA Haplogroups Associated with High or Reduced Spermatozoa Motility. *American journal of human genetics* **67** (3), 682–696.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239** (4839), 487–491.
- Sanger F; Coulson AR (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* **94** (3), 441–448.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74** (12), 5463–5467.
- Santorelli FM, Mak S-C, Vazquez-Memije ME, et al. (1996). Clinical Heterogeneity Associated with the Mitochondrial DNA T8993C Point Mutation. *Pediatric Research* **39** (5), 914.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research* **29** (1), 308–311.
- Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, et al. (1993). Mitochondrial DNA Variants Observed in Alzheimer Disease and Parkinson Disease Patients. *Genomics* **17** (1), 171–184.
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, et al. (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell* **61** (6), 931–937.
- Shokolenko IN, Wilson GL, Alexeyev MF (2014). Aging. A mitochondrial DNA perspective, critical analysis and an update. *World journal of experimental medicine* **4** (4), 46–57.
- Sikorska M, Sandhu JK, Simon DK, et al. (2009). Identification of ataxia-associated mtDNA mutations (m.4052TC and m.9035TC) and evaluation of their pathogenicity in transmitochondrial cybrids. *Muscle & nerve* **40** (3), 381–394.

- Smithies O (1955). Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochemical Journal* **61** (4), 629–641.
- Sofou K, Coe IFM de, Isohanni P, et al. (2014). A multicenter study on Leigh syndrome. Disease course and predictors of survival. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **9**, 52.
- Taanman J-W (1999). The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1410** (2), 103–123.
- Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, et al. (1992). Heteroplasmic mtDNA mutation (T---G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *American journal of human genetics* **50** (4), 852–858.
- The UniProt Consortium (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research* **45** (D1), D158-D169.
- Thorburn DR, Rahman J, Rahman S (2017). Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. In: Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora J. H. Bean, Heather C. Mefford et al. (Hg.) (1993-2017): GeneReviews®. Seattle (WA).
- Thyagarajan D, Shanske S, Vazquez-Memije M, et al. (1995). A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Annals of neurology* **38** (3), 468–472.
- Tsao CY, Mendell JR, Bartholomew D (2001). High mitochondrial DNA T8993G mutation (<90%) without typical features of Leigh's and NARP syndromes. *Journal of child neurology* **16** (7), 533–535.
- Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, et al. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1797** (2), 113–128.
- Uziel G, Moroni I, Lamantea E, et al. (1997). Mitochondrial disease associated with the T8993G mutation of the mitochondrial ATPase 6 gene. A clinical, biochemical, and molecular study in six families. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **63** (1), 16–22.

van de Leemput J, Chandran J, Knight MA, et al. (2007). Deletion at ITPR1 underlies ataxia in mice and spinocerebellar ataxia 15 in humans. *PLoS genetics* **3** (6), e108.

van de Warrenburg B, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, et al. (2002). Spinocerebellar ataxias in the Netherlands. Prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* **58** (5), 702–708.

van de Warrenburg BPC, Hendriks H, Durr A, et al. (2005). Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias. A study in a Dutch-French cohort. *Annals of neurology* **57** (4), 505–512.

Verny C, Guegen N, Desquiret V, et al. (2011). Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation. *Mitochondrion* **11** (1), 70–75.

Vik SB; Ishmukhametov RR (2005). Structure and function of subunit a of the ATP synthase of Escherichia coli. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **37** (6), 445–449.

Wallace DC (1995). 1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *American journal of human genetics* **57** (2), 201.

Wang Y; Brinton RD (2016). Triad of Risk for Late Onset Alzheimer's. Mitochondrial Haplotype, APOE Genotype and Chromosomal Sex. *Frontiers in aging neuroscience* **8**, 232.

Waring MJ (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology* **13** (1), 269–282.

Watson JD; Crick F (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171** (4356), 737–738.

White SL, Collins VR, Wolfe R, et al. (1999). Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993. *American journal of human genetics* **65** (2), 474–482.

Wong L-JC, Naviaux RK, Brunetti-Pierri N, et al. (2008). Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations. *Human mutation* **29** (9), E150-E172.



Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, et al. (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and cell biology* **10** (3), 233–238.

Xu T, Pagadala V, Mueller DM (2015). Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase. *Microbial cell* **2** (4), 105–125.

Zanni G; Bertini ES (2011). X-linked disorders with cerebellar dysgenesis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **6**, 24.

Zesiewicz TA, Wilmot G, Kuo S-H, et al. (2018). Comprehensive systematic review summary. Treatment of cerebellar motor dysfunction and ataxia: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **90** (10), 464–471.

Zimm BH; Levene SD (1992). Problems and prospects in the theory of gel electrophoresis of DNA. *Quarterly Reviews of Biophysics* **25** (2), 171.

## 11. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum Unterschrift

## 12. Danksagung

Die in dieser Arbeit verwendeten Analysedaten wurden bereitgestellt von PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) und The J. Craig Venter Institute (<http://sift.jcvi.org/>).

Mein Dank an dieser Stelle gilt Herrn Prof. Dr. Müller und den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der JLU Gießen, insbesondere Frau Stanek, für die Nutzung der Räumlichkeiten, die guten Arbeitsbedingungen, sowie die freundliche Unterstützung und Zusammenarbeit im Labor.

Aufs herzlichste danke ich auch der Betreuerin meiner Dissertation, Frau Prof. Dr. Nolte, für die exzellente Betreuung, ihr durchweg schnelles und gutes Feedback und die positive Kritik.

Zuletzt bedanke ich mich bei allen Freunden und Verwandten, die mich im Laufe der letzten Jahre motiviert und begleitet haben; und bei meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Ermutigung ich diese Arbeit nicht hätte schreiben können.